

Funktionelle Analyse starker MAMP-responsiver synthetischer Promotoren

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Mona Lehmeyer
aus Ibbenbüren

1. Referent: apl. Professor Dr. Reinhard Hehl

2. Referent: Professor Dr. Norbert F. Käufer

eingereicht am: 17.06.2015

mündliche Prüfung (Disputation) am: 26.08.2015

Druckjahr 2015

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

Lehmeyer, M., Kanofsky, K., Hanko, E.K.R., Ahrendt, S., Wehrs, M., Machens, F. and Hehl, R. (2015). Functional dissection of a strong and specific microbe-associated molecular pattern-responsive synthetic promoter. *Plant Biotechnol. J.*, doi: 10.1111/pbi.12357

Tagungsbeiträge:

Lehmeyer, M., Hanko, E.K.R., Wehrs, M., Machens, F., Hehl, R. (2014). The newly discovered WT-box confers strong and specific elicitor- and pathogen-responsive gene expression in *Arabidopsis thaliana*. 27. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen (25.-28. Februar 2014, Wermelskirchen-Dabringhausen, Deutschland)

Posterbeiträge:

Kanofsky, K., Lehmeyer, M., Hanko, E.K.R., Hehl, R. (2015). A novel type of salicylic acid induced binding activity detected with a tripartite *cis*-regulatory module from the *Arabidopsis DJ1E* promoter. 28. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen (24.-27. Februar 2015, Wermelskirchen-Dabringhausen, Deutschland)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	IX
1 Einleitung.....	12
1.1 Pflanzen und Phytopathogene	12
1.2 Pflanzen-Pathogen Interaktion	12
1.3 Die Rolle von Pflanzenhormonen in der pflanzlichen Pathogenabwehr	15
1.4 Synthetische Promotoren	18
1.5 Identifizierung neuer <i>cis</i> -Elemente mittels bioinformatischer und experimenteller Analysen.....	20
1.6 Zielsetzung.....	22
2 Material und Methoden	23
2.1 Chemikalien und Enzyme.....	23
2.2 Lösungen	23
2.2.1 Agarose Gelelektrophorese	23
2.2.2 Antibiotika- und Herbizid-Lösungen	24
2.2.3 Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	24
2.2.4 Plasmidpräparation aus Hefe-Zellen	25
2.2.5 Sterilisation und Aussaat von <i>A. thaliana</i> -Samen.....	26
2.2.6 Transformation von <i>A. thaliana</i>	26
2.2.7 Transformation von Hefe-Zellen.....	26
2.2.8 Isolation und Transformation von Petersilieprotoplasten	27
2.2.9 Proteinbestimmung nach Bradford.....	28
2.2.10 Luciferase-Assays	28
2.2.11 β -Glucuronidase-Assays.....	29
2.3 Medien	30
2.3.1 <i>E. coli</i>	30
2.3.2 <i>S. cerevisiae</i>	31
2.3.3 Petersilie-Zellkultur	32

2.4	Bakterien-, Hefe- und Pilz-Stämme	34
2.5	Pflanzenmaterial	34
2.6	Oligonukleotide und Peptide.....	35
2.7	Vektoren.....	35
2.8	Kits.....	36
2.9	Sonstige Materialien.....	36
2.10	Technische Geräte.....	36
2.11	Methoden	37
2.11.1	Fertigstellung und Bearbeitung von DNA-Konstrukten	37
2.11.2	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	37
2.11.3	RNA-Isolation aus <i>A. thaliana</i>	39
2.11.4	Reverse Transkription.....	39
2.11.5	Annealing von Oligonukleotiden.....	39
2.11.6	Agarose-Gelelektrophorese	40
2.11.7	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	40
2.11.8	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	40
2.11.9	Herstellung und Transformation elektrokompeter Zellen	40
2.11.10	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	41
2.11.11	Plasmidpräparation aus <i>S. cerevisiae</i>	42
2.11.12	Sequenzierung von DNA-Molekülen	43
2.11.13	Sequenzanalysen	43
2.11.14	Erstellung von Dauerkulturen.....	43
2.11.15	Klonierung von Reportergenkonstrukten für die Protoplasten- Transfektion.....	43
2.11.16	Klonierung von Reportergenkonstrukten zur nativen Promotoranalyse	44
2.11.17	Klonierung von Reportergenkonstrukten für Yeast One-Hybrid- Screenings.....	45
2.11.18	Klonierung von Transkriptionsfaktoren in den Klonierungsvektor pCR2.1	45
2.11.19	Klonierung von T-DNA-Konstrukten zur Überexpression von Transkriptionsfaktoren	45

2.11.20	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	46
2.11.21	Yeast One-Hybrid-Screening	47
2.11.22	Kultivierung einer Petersilien-Zellkultur	50
2.11.23	Isolation und Transformation von Petersilie-Protoplasten	50
2.11.24	Proteinbestimmung nach Bradford.....	52
2.11.25	Luciferase-Assays	52
2.11.26	Qualitative GUS-Färbungen.....	53
2.11.27	Quantitativer GUS-Assay	53
2.11.28	Kultivierung von <i>A. thaliana</i> in Steril- bzw. Erdkultur	54
2.11.29	Transformation und Selektion von <i>A. thaliana</i>	55
3	Ergebnisse.....	56
3.1	Die Sequenz 15 ist ein <i>cis</i> -regulatorisches Modul des <i>DJ1E</i> -Gens.....	56
3.1.1	Das CRM- <i>DJ1E</i> ist essentiell für die Pep25-responsive Genexpression	57
3.1.2	Die Multimerisierung des CRM- <i>DJ1E</i> führt zu einem linearen Anstieg der Pep25-Responsivität.....	58
3.1.3	Das CRM- <i>DJ1E</i> enthält drei funktionelle <i>cis</i> -Sequenzen.....	59
3.1.4	Hormon-Induktion des CRM- <i>DJ1E</i>	60
3.1.5	Das CRM- <i>DJ1E</i> vermittelt Pathogen- und SA- induzierte Reportergenaktivität in transgenen <i>A. thaliana</i> -Pflanzen	62
3.1.6	ORA59 und ERF10 sind Regulatoren des CRM- <i>DJ1E</i>	64
3.1.7	ORA59 benötigt die Kernsequenz GCCNCC zur Aktivierung der Genexpression.....	68
3.1.8	Keine direkte Interaktion von WRKY70 mit dem CRM- <i>DJ1E</i>	69
3.2	Die Sequenz 2 ist eine MAMP-responsive Sequenz des Gens At1g13990.....	71
3.2.1	Die MRS ist ausreichend für die Pep25-responsive Genexpression des Gens At1g13990.....	72
3.2.2	Die Multimerisierung der MRS-At1g13990 erhöht die Reportergenaktivität.....	73
3.2.3	Die MRS-At1g13990 enthält nur eine essentielle <i>cis</i> -Sequenz.....	74
3.2.4	Die MRS-At1g13990 vermittelt Pathogen-responsive Reportergenaktivität in <i>A. thaliana</i>	78

3.2.5	Transkriptionsfaktoranalyse	79
3.2.6	Kombinationsanalyse des CRM- <i>DJ1E</i> und MRS-At1g13990	81
4	Diskussion.....	84
4.1	Die WT-Box, eine neue MAMP-responsive <i>cis</i> -regulatorische Sequenz	84
4.2	Das CRM- <i>DJ1E</i> enthält eine ungewöhnliche AP2/ERF Bindestelle	85
4.3	Die Funktion des DJ1E im pflanzlichen Immunsystem ist noch weitgehend unerforscht.....	87
4.4	Die MRS-At1g13990 liegt in einer außergewöhnlich kurzen intergenischen Region	88
4.5	Die Multimerisierung von <i>cis</i> -Elementen erhöht die Pep25-Responsivität	90
4.6	Das CRM- <i>DJ1E</i> ist ein geeignetes <i>cis</i> -Element für die Entwicklung Pathogen-resistenter Pflanzen	91
5	Zusammenfassung	92
6	Literaturverzeichnis	94
7	Anhang	105
8	Materiallisten	121
8.1	Glycerinkulturen und DNA-Konstrukte	121
8.2	Primer und Oligonukleotide	134
9	Danksagung	139

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen	Bedeutung
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
4-MU	4-Methylumbelliferon
4-MUG	4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid
A	Adenin
ABA	Abscisinsäure
AMP	Adenosinmonophosphat
AP2	<i>apetala2</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
3-AT	3-Amino-1,2,4-triazole
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bZIP	<i>basic-domain leucine-zipper</i>
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
CaMV	Cauliflower Mosaik Virus
Carb	Carbenicillin
cDNA	Komplementäre DNA
COI1	<i>coronatine insensitive 1</i>
Col-0	Columbia 0
CRM	<i>cis</i> -regulatorisches Modul
CRT	<i>C-repeat</i>
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
DTT	Dithiolreitol
EAR	<i>ERF-associated amphiphilic repression</i>

etc.	et cetera
EDS1	<i>enhanced disease susceptibility1</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EREBP	<i>ethylene-responsive element binding proteins</i>
ERF	<i>ethylen response factor</i>
ET	Ethylen
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
ETI	<i>effector-triggered immunity</i>
ETS	<i>effector-triggered susceptibility</i>
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
GUS	β-Glucuronidase
h	Stunden
IF	Induktionsfaktor
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
ISR	<i>induced systemic resistance</i>
JA	Jasmonsäure
JA-Ile	Jasmonsäure-Isoleucin-Konjugat
JAR	<i>jasmonate response</i>
JAZ	<i>jasmonate zim</i>
JMT	<i>jasmonic acid carboxyl methyltransferase</i>
Kan	Kanamycin
LB	Luria Broth
LRR	<i>leucin-rich repeats</i>
LUC	Luciferase
MAMP	<i>microbe-associated molecular pattern</i>
MeJA	Methyljasmonat
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute
MRS	MAMP-responsive Sequenz
MS	Murashige-Skoog
MIT	<i>MAMP-triggered immune response</i>

NBS	<i>nucleotide binding site</i>
nm	Nanometer
NPR1	<i>non-expressor of PR genes 1</i>
OD	optische Dichte
OBF	ocs-bindenden Faktoren
OPDA	12-oxo-Phytodiensäure
PAD	<i>phytoalexin deficint</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
pBT10	pBT10GUS-d35SLUC
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDF	<i>plant defensin</i>
PEG	Polyethylenglycol
PG	Endopolygalacturonase
pH	<i>potential Hydrogenii</i>
PPA	Phytoprostane Typ A
PR	<i>pathogenesis-related</i>
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PTI	<i>PAMP-triggered immune response</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RLU	<i>relative light units</i>
RLK	<i>receptor-like kinases</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SA	Salizylsäure
SAR	<i>systemic acquired resistance</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat
sec	Sekunde
T	Thymin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TATA	TATA-Box (Minimalpromotor)
T-DNA	Transfer-DNA
TF	Transkriptionsfaktor
TFBS	Transkriptionsfaktorbindungsstelle

TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTSS	Typ-III-Sekretionssystem
UV	Ultraviolett
VSP2	<i>vegetative storage protein2</i>
Y1H	Yeats One-Hybrid
z.B.	zum Beispiel

Abkürzungen von Artnamen

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>B. cinerea</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>P. crispum</i>	<i>Petroselinum crispum</i>
<i>P. syringae</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung

Abbildung 1: Vier-Stufen-Modell der Pflanzen-Pathogen Interaktion.....	13
Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung der phytohormonellen Regulation der pflanzlichen Immunabwehr	16
Abbildung 3: Design eines synthetischen Promotors	19
Abbildung 4: Bioinformatische und experimentelle Arbeitsschritte zur Identifikation Pathogen-responsiver <i>cis</i> -Sequenzen	21
Abbildung 5: Tropfschema der 3-AT-Analyse des Bait-Stammes	48
Abbildung 6: Die Sequenz des 35 bp langen <i>cis</i> -regulatorischen Moduls (CRM- <i>DJ1E</i>) und dessen Position upstream vom ATG (+1) des <i>DJ1E</i> -Gens	56
Abbildung 7: Pep25-Responsivität der upstream-Promotorfragmente des Gens <i>DJ1E</i>	57
Abbildung 8: Pep25-Responsivität des Monomers, Dimers und Tetramers vom CRM- <i>DJ1E</i>	58
Abbildung 9: Pep25-Responsivität von Mutation 1, 2, 3 und 4 des CRM- <i>DJ1E</i>	60
Abbildung 10: SA-vermittelte Reportergenaktivität des CRM- <i>DJ1E</i> und mut1 bis 4	61
Abbildung 11: Pathogen- und Hormonbehandlung von transgenen CRM- <i>DJ1E</i> <i>A. thaliana</i> -Pflanzen	63
Abbildung 12: Reproduktion der Interaktion der Prey-Vektoren ERF10, ORA59 und MYB96 mit der Bait-Sequenz 4CRM- <i>DJ1E</i>	64
Abbildung 13: Interaktionstest vom Bait-Stamm der Mutation 4 des CRM- <i>DJ1E</i> mit der Prey-Vektoren ERF10 und ORA59	65
Abbildung 14: Kotransformation von ORA59 mit CRM- <i>DJ1E</i> und der Mutation 4	66
Abbildung 15: Kotransformation von ERF10 mit CRM- <i>DJ1E</i> und zusätzlicher Induktion mit Pep25.....	67
Abbildung 16: Kotransformation von ORA59 mit dem CRM- <i>DJ1E</i> und Mutation 5 bis 12	68
Abbildung 17: Interaktionstest vom Bait-Stamm des CRM- <i>DJ1E</i> mit dem Prey-Vektor WRKY70	70
Abbildung 18: Die Sequenz der 35 bp MAMP-responsiven Sequenz (MRS) und deren Position upstream vom ATG (+1) des At1g13990-Gens	71
Abbildung 19: Pep25-Responsivität der upstream-Promotorfragmente des Gens At1g13990.....	72

Abbildung 20: Pep25-Responsivität des Monomers, Dimers und Tetramers der MRS-At1g13990.....	74
Abbildung 21: Pep25-Responsivität von Mutation 1, 2 und 3 der MRS-At1g13990.....	75
Abbildung 22: Pep25-Responsivität von Mutation 4 bis 15 der MRS-At1g13990	76
Abbildung 23: Pathogenbehandlung von transgenen MRS-At1g13990 <i>A. thaliana</i> -Pflanzen	78
Abbildung 24: AthaMap-gestützte Identifikation putativer TF-Bindestellen der intergenischen und Pep25-essentiellen Region der MRS-At1g13990.....	80
Abbildung 25: Pep25-Responsivität der Kombinationselemente der Sequenzen 2 und 15 im Vergleich zur Wildtypsequenz.....	82
Abbildung 26: 3-AT Test des Bait-Stammes 4CRM- <i>DJ1E</i> . Kein Wachstum ab 50 mM 3-AT	105
Abbildung 27: 3-AT Test des Bait-Stammes 4CRM- <i>DJ1E</i> _w/o_GCC. Kein Wachstum ab 50 mM 3-AT	105
Abbildung 28: 3-AT Test des Bait-Stammes 2MRS-At1g13990. Wachstum bei 50 und 100 mM 3-AT, keine Inhibierung des Hintergrundwachstums möglich.....	106
Abbildung 29: 3-AT Test des Bait-Stammes 4MRS-At1g13990. Wachstum bei 50 und 100 mM 3-AT, keine Inhibierung des Hintergrundwachstums möglich.....	106
Abbildung 30: Hormon-vermittelte Reportergenaktivität des CRM- <i>DJ1E</i> und mut1b, 3 und 4	109

Tabellen

Tabelle 1: Induktionsfaktoren der Kombinationselemente im Vergleich zu den Wildtypsequenzen 2 und 15 (MRS-At1g13990; CRM- <i>DJ1E</i>)	82
Tabelle 2: Transkriptionsfaktoren der identifizierten Klone des Y1H-Screen mit CRM- <i>DJ1E</i> als Bait-Sequenz.	107
Tabelle 3: Transkriptionsfaktoren der identifizierten Klone des Y1H-Screen mit dem verkürzten CRM- <i>DJ1E</i> _w/o_GCC als Bait-Sequenz.....	108
Tabelle 4: Relative GUS-Werte der nativen Promotoranalyse des <i>DJ1E</i> -Gens (pmol 4-MU·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ ; Werte zu Abbildung 7)	110
Tabelle 5: Normalisierte GUS-Werte der Transformation des Mono-, Di- und Tetramers vom CRM- <i>DJ1E</i> (pmol 4-MU·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ , Werte zu Abbildung 8).....	111
Tabelle 6: Normalisierte GUS-Werte der Transformation des CRM- <i>DJ1E</i> und mut1-4 induziert mit Pep25 (pmol 4-MU·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ , Werte zu Abbildung 9).....	112

Tabelle 7: Normalisierte GUS-Werte der Transformation des CRM- <i>DJ1E</i> und mut1 bis 4 induziert mit SA (pmol 4-MU·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ , Werte zu Abbildung 10); Werte aus Kanofsky (2014).....	113
Tabelle 8: Normalisierte GUS-Werte der Kotransformation des CRM- <i>DJ1E</i> / mut 4 und ORA59 (pmol 4-MU·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ , Werte zu Abbildung 14).....	113
Tabelle 9: Normalisierte GUS-Werte der Kotransformation des CRM- <i>DJ1E</i> und ERF10 induziert mit Pep25 (pmol 4-MU·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ , Werte zu Abbildung 15).....	114
Tabelle 10: Normalisierte GUS-Werte der Kotransformation des CRM- <i>DJ1E</i> mut5 bis 12 und ORA59 (pmol 4-MU·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ , Werte zu Abbildung 16; Werte aus Ahrendt, 2014)	115
Tabelle 11: Normalisierte GUS-Werte der nativen Promotoranalyse des At1g13990-Gens (pmol 4-MU·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ , Werte zu Abbildung 19; Teilergebnisse aus Roling, 2015).....	116
Tabelle 12: Normalisierte GUS-Werte der Transformation des Mono-, Di- und Tetramers der MRS (pmol 4-MU·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ , Werte zu Abbildung 20; Gonzales, 2015).....	117
Tabelle 13: Normalisierte GUS-Werte der Transformation der MRS-At1g13990 und mut1 bis 3 induziert mit Pep25 (pmol 4-MU·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ , Werte zu Abbildung 21; Wehrs, 2012)....	118
Tabelle 14: Normalisierte GUS-Werte der Transformation der MRS-At1g13990 und mut4 bis 15 induziert mit Pep25 (pmol 4-MU·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ , Werte zu Abbildung 22).....	119
Tabelle 15: Normalisierte GUS-Werte der Transformation der Kombinationsanalyse (pmol 4-MU·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ , Werte zu Abbildung 25).....	120
Tabelle 16: Laborinterne Nummern der <i>E. coli</i> Glycerinkulturen und zugehörige DNA-Konstrukte.....	121
Tabelle 17: Laborinterne Nummern der <i>S. cerevisiae</i> Glycerinkulturen	131
Tabelle 18: Verwendete Oligos mit der entsprechenden Labornummer und Laborbezeichnung.....	134
Tabelle 19: Verwendete Primer mit der entsprechenden Labornummer, Namen und Verwendungszweck	137

1 Einleitung

1.1 Pflanzen und Phytopathogene

Pflanzen unterliegen aufgrund ihrer sessilen Lebensweise abiotischen oder biotischen Umweltfaktoren. Zu den abiotischen Umweltfaktoren zählen unter anderem Luftfeuchtigkeit, Trockenheit und Lichtverhältnisse, wohingegen zu den biotischen Faktoren unter anderem der Einfluss von Mikroorganismen gehört. Der größte Teil der zuletzt genannten Faktoren sind allerdings nicht Phytopathogene, sondern mutualistische oder kommensalistische Interaktionen mit der Pflanze (Danhorn und Fuqua, 2007). Die im Verhältnis dazu geringe Anzahl spezialisierter Pathogene, welche die Pflanze stark schädigen oder gar abtöten können, umfassen Bakterien, Viren, Pilze und Oomyceten. In der Landwirtschaft führt vor allem die Infektion durch Pathogene zu erheblichen Ernteaussfällen, was wiederum einen enormen wirtschaftlichen Schaden verursacht (Oerke, 2006).

Pflanzenpathogene verwenden diverse Lebensstrategien. Pathogene Bakterien können sich in den Zellzwischenräumen, den Apoplasten, vermehren, nachdem sie zum Beispiel über die Stomata oder über Wunden eingedrungen sind. Der Stilett von Nematoden und Blattläuse dringt direkt in die Pflanzenzelle ein. Pilze können direkt oder mittels verlängerter Hyphen in die pflanzliche Epidermalzelle eindringen. Diese können zwischen oder auf den Zellen liegen. Pathogene, symbiotische Pilze und Oomyceten können zudem mittels Haustorien in die Wirtszellenplasmamembran gelangen (Jones und Dangl, 2006).

1.2 Pflanzen-Pathogen Interaktion

Für die Abwehr von Pathogenen ist eine Interaktion zwischen Pflanze und Pathogen unausweichlich. Da Pflanzen, im Gegensatz zu tierischen Lebewesen, kein adaptives Immunsystem besitzen, sind sie vollständig auf ihre native Immunantwort angewiesen. Bei dieser kommt es in jeder infizierten Zelle zu einer Reaktion und mittels systemischer Signale werden weiter entfernte Gewebe alarmiert (Nürnberger *et al.*, 2004). Ob es bei der Pflanzen-Pathogen Interaktion zu einer Resistenz oder zur Krankheit der Pflanze führt, hängt von der Immunabwehr der Pflanze und der Virulenzstrategie des Phytopathogens ab. Die Interaktion von Pflanze und Pathogen kann insgesamt als eine Art evolutionärer Prozess angesehen werden. Bei diesem kommt es, für die Erlangung eines Selektionsvorteils, abwechselnd zur Anpassung der Pflanze und des Pathogens. Das in Abbildung 1 gezeigte vier Stufen Modell stellt den Verlauf der Infektion in vier Abschnitten dar (Bent *et al.*, 2007).

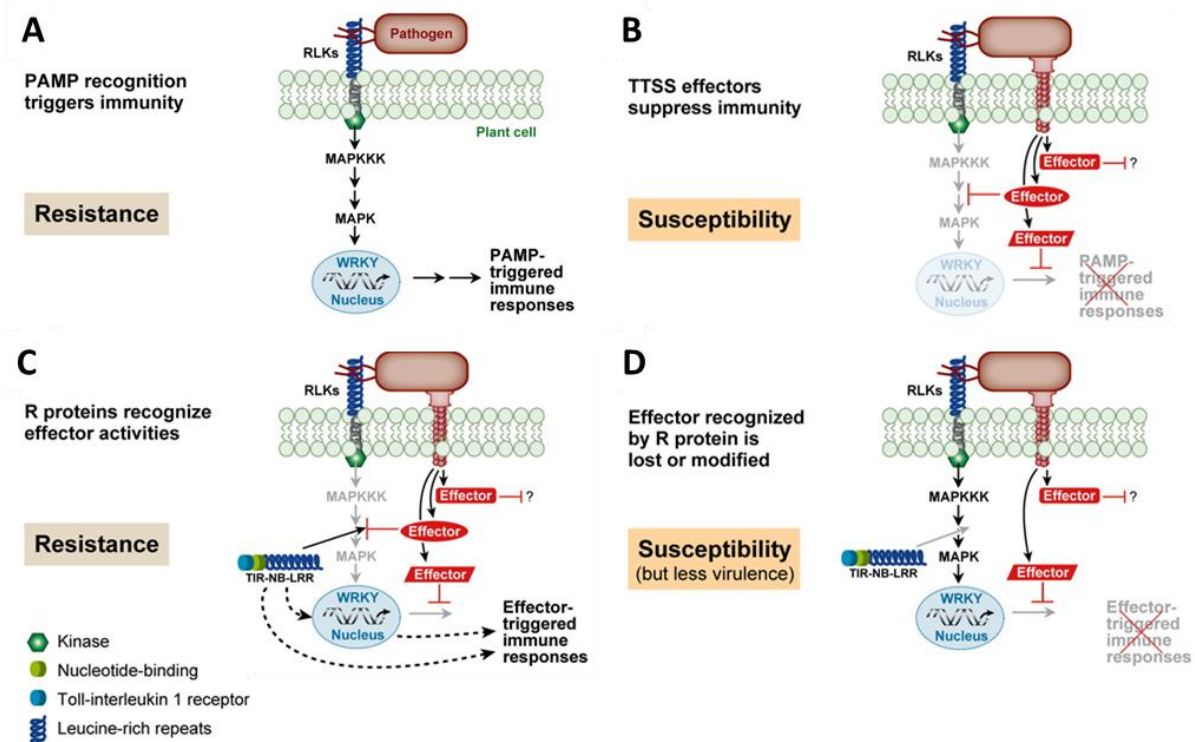


Abbildung 1: Vier-Stufen-Modell der Pflanzen-Pathogen Interaktion

A: Die Wahrnehmung von Phytopathogenen erfolgt über PAMPs/MAMPs mittels RLKs. Durch die Signalübermittlung über eine MAP-Kinase-Kaskade kommt es im Zellkern zu einer Modifikation des Transkripts, was zu einer Aktivierung des PTI führt. Die Pflanze ist resistent. B: Durch den Transfer von Effektoren, wie z.B. über das Typ-III-Sekretionssystem in die Pflanzenzelle, kommt es zu einer Unterdrückung des PTI. Dies führt zur Erkrankung der Pflanze. C: Mit Hilfe von pflanzlichen R-Proteinen werden die Virulenzfaktoren erkannt, wodurch die ETI ausgelöst wird und es zur Resistenz der Pflanze kommt. D: Pathogene können, um einer ETI entgegenzuwirken, Effektoren modifizieren oder eliminieren. Hierdurch kommt es zur erneuten Erkrankung der Pflanze (Modifiziert nach Bent *et al.*, 2007).

Im ersten Schritt werden von Mikroorganismen ausgehende PAMPs (*pathogen-associated molecular pattern*) bzw. MAMPs (*microbe-associated molecular pattern*) durch Zellmembranrezeptoren von der Pflanze erkannt. Diese hochkonservierten Strukturen befinden sich meist auf der Zelloberfläche der Mikroorganismen und sind nicht spezifisch für ein bestimmtes Pathogen. Beispiele für MAMPs sind bakterielles Flagellin, pilzliches Chitin oder Peptidoglycane von bakteriellen Zellwänden. Bei den membranständigen Rezeptoren (PRRs; pattern recognition receptor), welche die MAMPs außerhalb der Zelle erkennen, handelt es sich um Rezeptor-ähnliche Kinasen (receptor-like kinases, RLKs). Etwa 2,5 % des Protein-codierenden Genoms von *Arabidopsis thaliana* codieren für über 600 RLKs. Eine für die pflanzliche Immunabwehr bedeutsamste Subfamilie ist die der LRR-Kinasen (Leucine rich repeat kinases) (Shiu *et al.*, 2001). Von ihnen wurden mehr als 200 LRR-Kinasen gefunden, welche potenzielle MAMP-Rezeptoren darstellen (Jones und Dangl, 2006). Nach der Erkennung des PAMPs/MAMPs, durch dessen Bindung an die LRR-Domäne des PRRs, wird das Signal in das Zellinnere weitergeleitet. Dort wird die sogenannte PTI bzw. MTI (PAMP/MAMP-triggered immune response) ausgelöst (Bent und

Mackey 2007, Glowacki *et al.* 2011, siehe Abbildung 1 A). Diese umfasst eine MAP-Kinase-Kaskade welche, die Expressionsmuster im Zellkern so ändert, dass diese eine Resistenzreaktion implizieren. Bei dieser Resistenz handelt es sich um die basale Immunantwort der Pflanzen, welche, im Vergleich zum ETI (s.u.), relativ schwach und langsam abläuft. Die Resistenzreaktionen umfasst die Produktion von z.B. reaktiven Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“, ROS, s.u.), Stickstoffmonoxid (NO) oder Phytoalexinen, sowie die Schließung der Stomata oder die Einlagerung von Lignin und Kallose in die Zellwand (He *et al.* 2007). Für das Auslösen einer Pathogenantwort ist das Überschreiten eines MAMP-Schwellenwertes erforderlich, was eine Reaktion gegenüber Nicht-Pathogenen Mikroorganismen verhindern soll (Bent und Mackey, 2007). Durch unterschiedliche PAMPs/MAMPs eines oder verschiedener Phytopathogene können analog konvergente Abwehrantworten ausgelöst werden (He *et al.*, 2007).

Es gibt spezialisierte Mikroorganismen, welche durch die Bildung von Virulenzfaktoren (Effektoren) aktive Teile der basalen Immunantwort (PTI bzw. MTI) inhibieren (Abbildung 1 B). Dies wird als Effektor-ausgelöste Empfindlichkeit (ETS, effector triggered susceptibility) bezeichnet. Ein Pathogen besitzt gewöhnlich 20 bis 100 Virulenzfaktoren, welche aktiv in die Wirtszelle entlassen werden. Es kann sich bei ihnen entweder um Toxine oder um Effektor-Proteine handeln. Bakterielle Effektoren, wie jene vom avirulenten *Pseudomonas syringae*-Stamm, gelangen über das Typ-III-Sekretionssystem (*hrp*-Pillus) in das Cytoplasma der Pflanzenzelle (Heath 2000, Jones und Dangl 2006). Es konnte gezeigt werden, dass durch Typ-III-Sekretionssystem-Mutanten eine effektive Kolonisierung des pflanzlichen Wirtes nicht möglich ist (Mudgett, 2005). Da durch den Einfluss der Effektoren die PTI bzw. MTI vermindert wird, ist es dem Pathogen leichter möglich sich zu vermehren und somit die Pflanze stärker zu schädigen (Jones *et al.*, 2006).

Als Antwort auf die Virulenzfaktoren werden von der Pflanze Resistenz (R)-Gene entwickelt, welche die Anwesenheit bestimmter Effektoren direkt als auch indirekt wahrnehmen können (Abbildung 1 C). Diese R-Gene besitzen eine LRR-Domäne und eine Nukleotid-bindungsstelle (*nucleotide binding site*) (NBS). Die LRR-Domäne reguliert die Aktivität des Proteins und erkennt den Effektor, wohingegen die NBS-Domäne zuständig für die Signalweiterleitung und die ATP-Hydrolyse ist (Belkhardir *et al.*, 2004). Nachdem der Effektor durch die LRR-Domäne erkannt wurde kommt es zu einer wesentlich stärkeren Reaktion der Pflanze, zur Effektor-ausgelösten Immunität (ETI, effector triggered immunity). Der für die ETI verantwortliche Effektor wird als Avirulenzfaktor bezeichnet (Jones *et al.*, 2006). Meistens kommt es durch die ETI zu einer hypersensitiven Reaktion, bei welcher es zu einem schnellen, lokalen Zelltod oder zur Signalweiterleitung in umliegende bzw. weiter

entfernte Zellen kommt. Die Pflanze ist resistent gegenüber dem Pathogen und zudem auch bei weiteren Pathogenangriffen geschützt (Bent und Mackey 2007, Glowacki *et al.* 2011).

Pathogene können das ETI umgehen, indem ihre Effektoren eliminiert oder modifiziert werden. Das entsprechende Phytopathogen kann dadurch nicht mehr durch die R-Proteine erkannt und bekämpft werden, jedoch ist es auf dieser Weise auch weniger virulent (Bent und Mackey 2007, Abbildung 1 D).

1.3 Die Rolle von Pflanzenhormonen in der pflanzlichen Pathogenabwehr

Phytopathogene besitzen viele verschiedene Strategien, mit welchen sie die Pflanzen infizieren können. Grundsätzlich werden sie jedoch in drei Gruppen eingegliedert, wobei die Einteilung nach ihrer Lebensweise erfolgt. Die Gruppe der nekrotrophen Pathogene können über Phytotoxine die Wirtszellen abtöten und sich daraufhin vom abgestorbenen Gewebe ernähren. Ein Beispiel für diese Lebensweise ist der Pilz *Botrytis cinerea* (*B. cinerea*). Er ist verantwortlich für den Grauschimmel, welcher als Phytotoxin Botrydial erzeugt (Rebordinos *et al.*, 1995). Die biotrophen Pathogene beziehen ihre Nährstoffe, im Gegensatz zu den nekrotrophen, aus dem lebenden Gewebe des Wirtes. Sie verwenden dafür meist spezialisierte Strukturen, welche ein Eindringen in den Wirt ohne nennenswerte Schädigungen ermöglicht. Ein typisches Biotroph ist *Hyaloperonospora parasitica*, besser bekannt als der weiße Mehltau. Er verwendet für das Eindringen in den Wirt Haustorien (Glazebrook, 2005). Die letzte Gruppe sind die Hemi-Biotrophen Pathogene, welche sowohl biotroph, als auch nekrotroph sein können. Dies ist abhängig von dem Lebenszyklus des jeweiligen Organismus. Hier kann *Pseudomonas syringae* als Beispiel aufgeführt werden (Glazebrook, 2005).

Die pflanzliche Abwehr muss gegen verschiedene Phytopathogene präzise reguliert werden. So können z.B. bei einer hypersensitiven Reaktion mit reguliertem Zelltod biotrophe Mikroorganismen abgewehrt, nekrotrophe Pathogene und deren Wachstum hingegen begünstigt werden. Phytohormone spielen bei dieser Regulation eine wichtige Rolle, wobei drei dieser Hormone ganz besonders entscheidende Funktionen einnehmen (Pieterse *et al.*, 2009). Salizylsäure (SA) ist in der Regel an der Aktivierung von Abwehrreaktionen gegen biotrophe und hemi-biotrophe Krankheitserreger beteiligt, sowie an dem Erwerb der systemisch erworbenen Resistenz (Grant und Lamb, 2006). Diese ist eine dauerhafte und in der ganzen Pflanze ausgedehnte Resistenz, welche auch 'systemic acquired resistance' genannt wird (Gaffney *et al.*, 1993). Wenn ein Phytopathogen eine PTI in der Pflanzenzelle auslöst, kommt es zur Synthese von SA. Die Regulation erfolgt durch die Proteine

'*enhanced disease susceptibility1*' (EDS1) und '*phytoalexin deficient4*' (PAD4) (Wiermer *et al.*, 2005). Die SA akkumuliert, was eine Veränderung des Redoxlevels bewirkt. Daraufhin wechselt das Protein '*non-expressor of PR genes1*' (NPR1) von der passiven in eine aktive Form, wodurch es in den Zellkern gelangen kann. Dort kommt es zu einer Interaktion mit TGA Transkriptionsfaktoren (TFs) (Dong, 2004), welche anschließend an Promotoren von SA-induzierten Genen binden können (Dong *et al.*, 2003). Nach der Aktivierung einer SA-Signalkaskade durch eine Infektion, kommt es in distalen, pflanzlichen Geweben zu einer entsprechenden Immunreaktion. Diese systemisch erworbene Resistenz wirkt somit einer Verbreitung des Pathogens in der Pflanze entgegen.

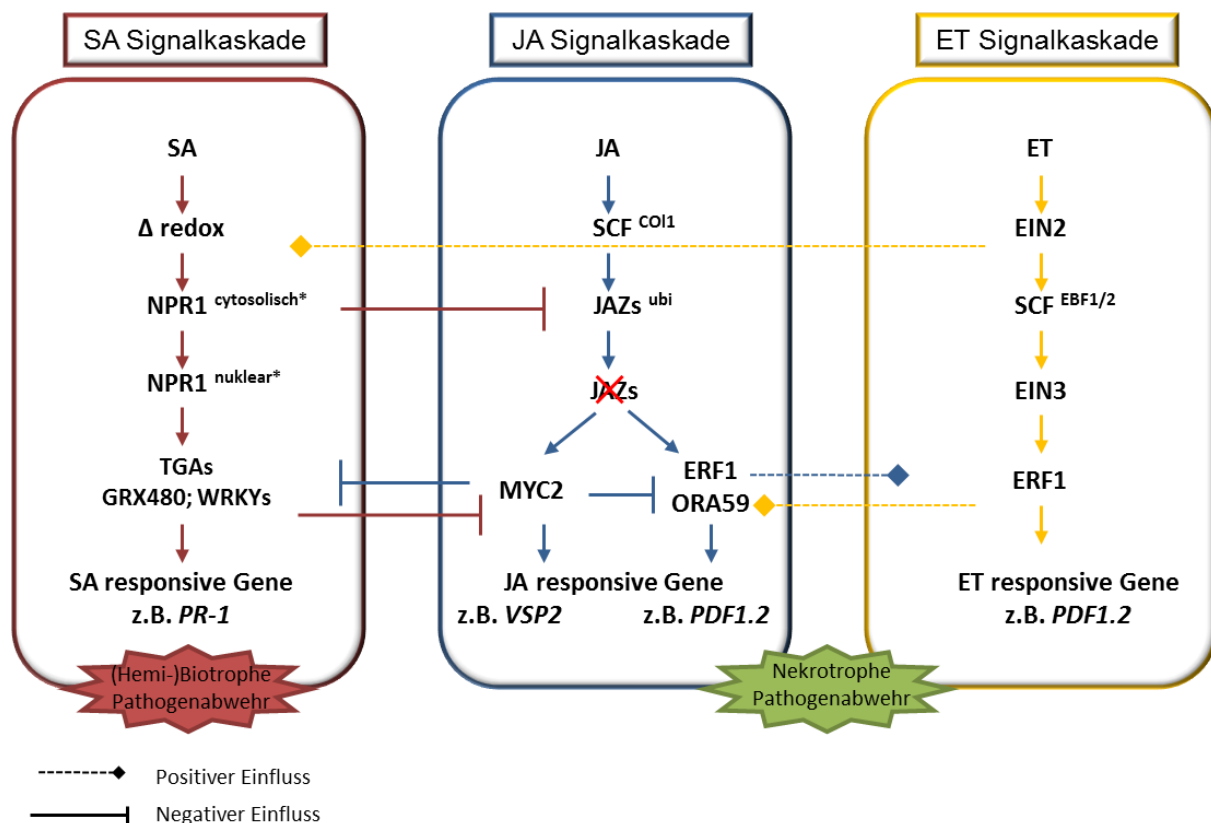


Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung der phytohormonellen Regulation der pflanzlichen Immunabwehr

In der pflanzlichen Immunabwehr sind die Phytohormone Salizylsäure (SA), Jasmonsäure (JA) und Ethylen (ET) die bedeutendsten Regulatoren. Biotrophe und hemibiotrophe Pathogene werden über die SA-Signalkaskade abgewehrt (rot). Die JA-Signalkaskade (blau) und ET-Signalkaskade (gelb) spielen in der nekrotrophen Pathogenabwehr eine entscheidende Rolle. Zudem können sich die verschiedenen Signalkaskaden blockieren (negativer Einfluss) als auch fördern (positiver Einfluss) (modifiziert nach Pieterse *et al.*, 2009).

Mutanten, welche einen Defekt in der Akkumulation von SA besitzen, zeigten eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber biotrophen und hemi-biotrophen Pathogenen und einen reduzierten Erwerb der systemischen Resistenz (Nawrath und Metreux, 1999). Es konnte zudem gezeigt werden, dass Methylsalizylsäure, welche nach einer Pathogeninfektion induziert wird, als mobiler Induktor der systemisch erworbenen Resistenz in Tabak wirkt (Park *et al.*, 2007).

Im Gegensatz zu SA ist die Jasmonsäure (JA) und entsprechende Derivate bei der Immunreaktion gegen nekrotrophe Pathogene beteiligt (Glazebrook, 2005). Nach der Synthese von JA, wird diese in unterschiedlich biologisch aktive Metabolite umgesetzt. Dies kann einerseits z.B. Methyljasmonat (MeJA) (Turner *et al.*, 2002) oder andererseits Jasmonsäure-Isoleucin-Konjugat (JA-Ile) (Staswick *et al.*, 2004) sein. Als Rezeptor für das JA-Ile dient das F-box Protein '*coronatine insensitive1*' (COI1), welches als E3 ubiquitinligase '*SKP1-Cullin-F-box*' Komplex SCF_{coi1} vorliegt. Durch das Erkennen der JA kommt es zur Ubiquitinierung des Repressors '*jasmonate zim*' (JAZ), was eine anschließende Degradation im 26S Proteasom bewirkt. Mit der Bindung von JAZ an entsprechende TFs, wie z.B. MYC2, wird die Transkription reprimiert. Der JA-Signalweg teilt sich an dieser Stelle in zwei Wege auf. Zum einen kommt es zur Regulation durch MYC-TFs, wobei das '*vegetative storage protein2*' (VSP2) als Markergen fungiert. Zum anderen kommt es bei der Kombination mit Ethylen zur Regulation der Genexpression durch '*apetala2/ethylen response factor*' (AP2/ERF)-Transkriptionsfaktoren, wie z.B. bei dem Markergen *plant defensin1.2* (PDF1.2) (Pieterse *et al.*, 2009).

Auch Ethylen (ET) spielt eine entscheidende Rolle bei der Abwehr von nekrotrophen Pathogenen. Das Phytohormon liegt gasförmig vor und wird über den membranständigen Rezeptor ETR1 von der Pflanzenzelle erkannt, wobei dieser als negativer Regulator in der ET-Signalkaskade wirkt (Kendrick *et al.*, 2008). Bei Abwesenheit von ET übermittelt der Rezeptor ein Signal an das Protein CTR1, wodurch der positive Regulator EIN2 inhibiert wird. Bei der Anwesenheit von ET kommt es zur Bindung an den membranständigen Rezeptor, wodurch keine Signalübertragung an CTR1 erfolgen kann und EIN2 aktiv bleibt. EIN2 inhibiert einen SCFEBF1/2-abhängigen Abbau von EIN3, ein DNA-bindendes Protein, welches mit den Promotoren von ERF-Genen interagiert. Durch die Bindung von EIN3 an diese Promotoren kommt es zur Transkription von TFs, wie z.B. ERF1, was zur weiteren Expression ET-responsiver Gene führt (Kendrick *et al.*, 2008).

Der "Cross-talk" zwischen Salizylsäure (SA)-, Jasmonsäure (JA)- und Ethylen (ET)-Signalwegen ist ein wichtiger Regulationsmechanismus in der pflanzlichen Pathogenabwehr (Abbildung 2; Spoel *et al.*, 2007). Aufgrund der synergetischen Signalwirkung von JA und ET fördern beide Hormone die Expression von PDF1.2, welches somit als Markergen beider Hormonkaskaden dient. Die Expression des Proteins wird durch ERF-TFs reguliert, wobei ERF1 und ORA59 einen positiven Effekt auf beide Weiterleitungen haben (Lorenzo *et al.*, 2003; Pré *et al.*, 2008). Der Transkriptionsfaktor MYC2, welcher bedeutend für die JA-responsive Genexpression ist, wirkt positiv auf die Expression von VSP2. Im Gegensatz dazu werden JA/ET-responsive Gene, wie PDF1.2, durch MYC2 reprimiert (Lorenzo *et al.*, 2004). Wie der Abbildung 2 zu entnehmen ist, wird die JA-regulierte Immunantwort über die

An- bzw. Abwesenheit von ET reguliert. Auch auf die SA-Signalkaskade scheint ET einen positiven Effekt zu haben. Untersuchungen ergaben, dass in ET-unempfindlichen *ein2*-Mutanten eine SA-Induzierte PR-1 Expression inhibiert wird (De Vos *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu ergaben weitere Analysen, dass SA und JA eher antagonistisch miteinander interagieren, da sie sich in ihren Signalwegen inhibieren. Bei einem Anstieg von SA und dem damit verbundenen Anstieg des Redoxlevels, sowie des cytosolischen NPR1, ist die Inhibierung der JA-Signalkaskade verzeichnet worden (Koornneef *et al.*, 2008; Spoel *et al.*, 2007). Diese Theorie wird auch beruhend auf der Tatsache gestützt, dass die jeweilig aktivierenden TFs vom SA- als auch vom JA-Signalweg antagonistisch wirken. Als Beispiel dient WRKY70, welcher als positiver Regulator in der SA-Signalkaskade und als negativer im JA-Signalweg dient (Li *et al.*, 2006).

Es gibt zu den drei genannten noch weitere Phytohormone, welche in der pflanzlichen Immunabwehr von Bedeutung sind, wie z.B. Abscisinsäure. Diese gliedern sich in das geschilderte Netzwerk ein (Pieterse *et al.*, 2012).

1.4 Synthetische Promotoren

In den Promotoren Pathogen-induzierter Gene sind *cis*-Elemente enthalten, die unabhängig vom nativen Promotorkontext, eine induzierbare Expression bewirken können (Rushton *et al.*, 2002). Diese *cis*-Elemente können für die Erstellung von synthetischen Promotoren genutzt werden, wie es in Abbildung 3 dargestellt ist. Es konnte bereits gezeigt werden, dass native Pathogen-induzierte Promotoren, im Gegensatz zu synthetischen Promotoren, weniger geeignet sind (Kooshki *et al.*, 2003). Die Stärke und Induzierbarkeit der künstlichen Promotoren hängt mit Anzahl, Reihenfolge und Kombination der unterschiedlichen *cis*-Elemente zusammen. Diese können, im Gegensatz zu nativen Promotoren, frei gewählt werden. Auch der Abstand zueinander oder zur TATA-Box kann einen starken Einfluss auf die Funktion des *cis*-Elementes haben (Rushton *et al.*, 2002). Synthetische Promotoren wurden bereits erfolgreich in Studien bei Pflanzen genutzt, um entweder die Rolle des *cis*-Elementes genauer zu untersuchen oder aber die Induzierbarkeit des Zielgens zu regulieren (Pua und Davey, 2010). Es wurden unter anderem bereits *cis*-Elemente analysiert, welche im Zusammenhang mit Hitzeschock (Pietrzak *et al.*, 1989), Entwicklung (Puente *et al.*, 1996), Licht (Gilmartin *et al.*, 1990), Gewebe-Spezifität (Ni *et al.*, 1995/6), Kältestress (Zhu *et al.*, 2008) oder Verwundung und Pathogen-Befall (Rushton *et al.*, 2002) stehen. Synthetische Promotoren finden vielseitig Verwendung. So können sie als Reporter für Mutanten-Screens verwendet werden, wie zum Beispiel bei Oono *et al.* (1998). Hier wurde mittels der Auxin-responsiven *cis*-Elemente A and B (AuxRD A and AuxRD B; Ballas *et al.*, 1995) eine Ethan-Methylsulfonat-mutagenisierte Population von *Arabidopsis*-Pflanzen gescreent.

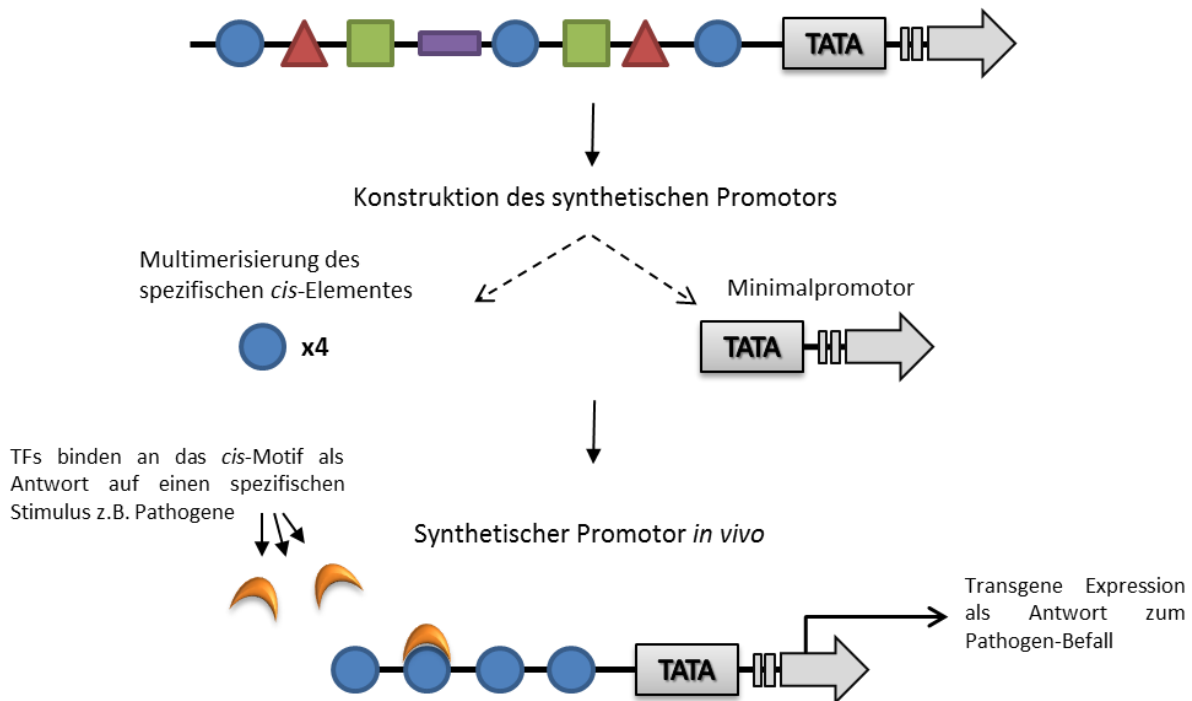


Abbildung 3: Design eines synthetischen Promotors

Fusion von multimerisierten, spezifischen *cis*-Elementen an einen Minimalpromotor. Vorangegangene Studien über das *cis*-Motif, speziell in Verbindung stehend mit einem spezifischen Stimulus (z.B. Pathogen-Befall), erlauben die Konstruktion eines Pathogen-responsiven, synthetischen Promotors (Modifiziert nach Pua und Davey, 2010).

Durch das Überleben von Pathogenen oder Insekten gegenüber Pestiziden und biologischen Pflanzenschutzmitteln, kommt es zu deren explosionsartigen Vermehrung (Moffat, 2001). Eine Alternative zu den konventionellen Methoden der Pathogenbekämpfung ist der Einsatz von synthetischen Promotoren in Pflanzen. Möglichkeiten der durch synthetische Promotoren verbesserten Pflanzenabwehr sind Eingriffe in die Replikation von Viren in der Pflanze, der Expression von für Pathogene toxischen Genprodukten oder die Verbesserung von Pflanzen-eigenen Resistenzmechanismen (Rushton *et al.*, 2002). Zudem ist es auch möglich transgene Pflanzen, welche synthetische Promotoren beinhalten, als Früherkennungssystem einer pflanzlichen Infektion zu nutzen (Mazarei *et al.*, 2008).

Eine weitere Möglichkeit ist es, bei einer Infektion Zelltod-induzierende Gene zu exprimieren um einen Befall der Pflanze entgegenzuwirken (Niemeyer *et al.*, 2013). Hierzu müssen in einem synthetischen Promotor gut regulierte *cis*-Elemente mit niedriger Hintergrundaktivität eingesetzt werden. Solche *cis*-Elemente wurden bis jetzt noch nicht identifiziert. Ziel einer Kooperation der KWS Saat AG und der AG Hehl war es, neue Pathogen-responsive synthetische Promotoren zu identifizieren um somit deren Spektrum zu erweitern.

1.5 Identifizierung neuer *cis*-Elemente mittels bioinformatischer und experimenteller Analysen

Für die Identifikation noch unbekannter *cis*-Elemente gibt es verschiedene Herangehensweisen. Bei Koschmann *et al.* (2012) wurden mittels bioinformatischer und experimenteller Analysen *cis*-Elemente gefunden, welche aus Promotoren von Genen stammen, die während der Pathogenantwort koreguliert werden. Wichtig bei den Untersuchungen war es, dass sie ein breites Spektrum von Pathogenen bzw. MAMPs umfassen. Dabei lag der Focus der Untersuchungen vor allem auf pilzlichen Pathogenen bzw. Stimuli. Die in der Datenbank PathoPlant (Bülow *et al.*, 2007) aufgeführten Microarray-Daten aus *A. thaliana* dienten als Ausgangsmaterial der bioinformatischen Analyse. In Abbildung 4 A sind die wesentlichen Schritte der Verfahrensweise komprimiert aufgeführt.

Es wurden 510 hochregulierte Gengruppen (mindestens um den Faktor 2) identifiziert. Dies geschah mit Hilfe einer Datenbankabfrage mit der Kombination von ein bis sechs unterschiedlichen pilzlichen Stimuli. Die Promotoren (1000 bp vor dem Transkriptionsstart) der Gengruppen wurden mittels der Software BEST (Binding site Estimation Suite of Tools, Che *et al.*, 2005) auf konservierte *cis*-regulatorische Elemente untersucht. Dies geschah unter der Annahme, dass koregulierte Gene durch die gleichen Transkriptionsfaktoren reguliert werden. Infolge dieser Untersuchungen konnten insgesamt 407 verschiedene Sequenzmotive identifiziert werden. Im darauffolgenden Schritt wurden diese mittels STAMP in 37 Motivgruppen eingeteilt und weiter untersucht (Mahony und Benos, 2007). STAMP ist ein Web-Tool, welches Ähnlichkeiten von DNA-Bindemotiven erkennen kann. Aus den Motivgruppen wurde anschließend ein Stammbaum erstellt, welcher in Abbildung 4 B dargestellt ist. Danach wurde nach Analogien zwischen den untersuchten Motivgruppen mit bereits bekannten *cis*-Elementen gesucht. Hierfür wurde zunächst mit Hilfe von STAMP (Mahony und Benos, 2007) ein „family binding profil“ (FBP) aus allen Motiven innerhalb einer Motivgruppe erstellt. Darauffolgend wurden diese mit bereits bekannten *cis*-Sequenzen aus den Datenbanken AthaMap, AGRIS und PLACE verglichen (Bülow *et al.*, 2006; Davuluri *et al.*, 2003; Higo *et al.*, 1999; Palaniswamy *et al.*, 2006; Steffens *et al.*, 2004). Unter den zahlreichen unbekannten Transkriptionsfaktorbindestellen (TFBS) waren auch einige bekannte vertreten, welche zum Teil in der pflanzlichen Immunabwehr einen nennenswerten Einfluss haben, wie zum Beispiel die TF-Familien MYB, AP2/ERF und WRKY (Tsuda *et al.*, 2015).

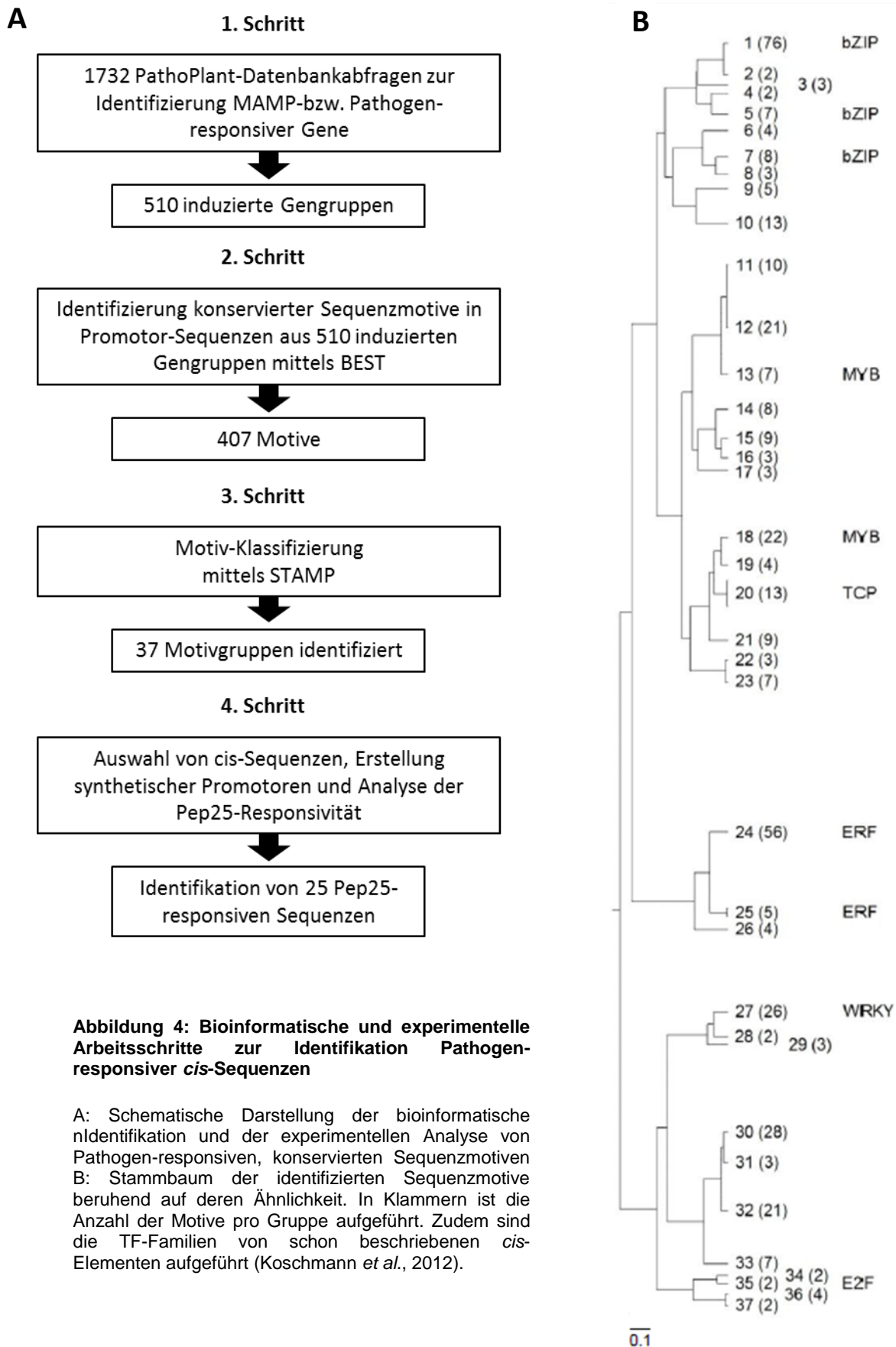


Abbildung 4: Bioinformatische und experimentelle Arbeitsschritte zur Identifikation Pathogen-responsiver *cis*-Sequenzen

A: Schematische Darstellung der bioinformatischen Identifikation und der experimentellen Analyse von Pathogen-responsiven, konservierten Sequenzmotiven
 B: Stammbaum der identifizierten Sequenzmotive beruhend auf deren Ähnlichkeit. In Klammern ist die Anzahl der Motive pro Gruppe aufgeführt. Zudem sind die TF-Familien von schon beschriebenen *cis*-Elementen aufgeführt (Koschmann *et al.*, 2012).

Nach der bioinformatischen folgte die experimentelle Analyse der *cis*-Elemente mittels synthetischer Promotoren. Diese bestehen aus Tetrameren einzelner *cis*-Sequenzen, welche über Linkersequenzen verbunden sind. Die Untersuchungen wurden im Petersilie-Protoplastensystem durchgeführt, wobei das MAMP Pep25 aus *Phytophthora sojae* als Elicitor fungierte. Es konnte gezeigt werden, dass insgesamt 25 von 76 untersuchten Sequenzen Pep25-Responsiv sind. Diese stammen aus zehn unterschiedlichen Motivgruppen (Koschmann *et al.*, 2012).

1.6 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zwei der stärksten Pep25-responsiven *cis*-Sequenzen funktionell zu charakterisieren. Die Sequenzen 15 und 2 aus der Arbeit von Koschmann *et al.* (2012) zeigen eine sehr hohe Pep25-vermittelte Reportergenaktivität im Petersilien-Protoplastensystem. Diese *cis*-Elemente sollten zunächst im nativen Promotorkontext analysiert werden, um zu prüfen, ob das *cis*-Element auch im ursprünglichen System auf das oomycetische MAMP Pep25 reagiert. Auch die Auswirkung der Multimerisierung im synthetischen Promotor sollte untersucht werden. Hierfür sollten die Pep25-vermittelten Reportergenaktivitäten von Mono-, Di- und Tetrameren miteinander verglichen werden. Eine mögliche Induktion durch in der pflanzlichen Immunabwehr involvierte Signalmoleküle sollte ebenfalls ein Bestandteil dieser Arbeit sein. Hierfür sollte zum einen das Petersilien-Protoplasten-System und zum anderen transgene *Arabidopsis*-Pflanzen verwendet werden. Der Einfluss auf die Induzierbarkeit durch unterschiedliche Kombinationen der Sequenzen 15 und 2 sollte zusätzlich erforscht werden. Zudem galt es, durch Mutationsanalysen den für die Pep25-Induktion essentiellen Bereich beider Sequenzen genauer zu kartieren. Transkriptionsfaktoren, welche mit diesen Bereichen interagieren, galt es zu identifizieren.

Ein ebenfalls wichtiger Bestandteil dieser Arbeit war es, die Sequenzen in stabil transformierten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen auf die Responsivität gegenüber unterschiedlicher Pathogene zu testen. Zum einen gegenüber dem necrotrophen Pilz *Botrytis cinerea* und zum anderen dem biotrophen bzw. hemi-biotrophen Bakterium *Pseudomonas syringae*, virulent als auch avirulent.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Standard-Chemikalien sind in der Regel von den Firmen Applichem (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) oder Sigma-Aldrich (München, Deutschland) bezogen worden. Es wird bei weniger gebräuchlichen Chemikalien der Hersteller bzw. die Bezugsquelle angegeben. PEG-4000 für die Transformation von *Arabidopsis*-Protoplasten ist ausschließlich bei Sigma-Aldrich (München, Deutschland) bestellt worden (Bestnr. 81242), da dieses kritisch für hohe Transformationseffizienzen ist (Yoo *et al.*, 2007).

Restriktionsenzyme sowie häufig verwendete DNA-modifizierende Enzyme (Phosphatase, T4-Ligase etc.) wurden von Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA, ehemals Fermentas) bezogen.

2.2 Lösungen

Alle Lösungen, sofern nicht anders angegeben, wurden mit dH₂O angesetzt. Die Medien/ Lösungen wurden für 20 min autoklaviert und bei RT gelagert. Diese wurden sortiert nach ihrem Verwendungszweck aufgelistet, mit Ausnahme einiger allgemein verwendeten Medien.

TE

10 mM Tris-HCl aus 1 M Stammlösung, pH 8

1 mM EDTA aus 0,5 M Stammlösung, pH 8

LTE

10 mM Tris-HCl aus 1 M Stammlösung, pH 7,5

0,1 mM EDTA aus 0,5 M Stammlösung, pH 8

2.2.1 Agarose Gelelektrophorese

50x TAE

2 M TRIS

1 M Essigsäure

0,05 M EDTA aus 0,5 M Stammlösung, pH 8

10x DNA-Ladepuffer

0,25 % (w/v) Bromphenolblau

0,25 % (w/v) Xylen-Cyanol

25 % (v/v) Ficoll-400

2.2.2 Antibiotika- und Herbizid-Lösungen

Alle Antibiotika sind, soweit nicht anders angegeben, in dH₂O gelöst worden. Vor der Lagerung bei -20 °C wurden sie zudem mittels eines Spritzenfilters mit 0,45 µm Porenweite sterilfiltriert.

Carbenicillin-Stammlösung

100 mg/ml Carbenicillin-Dinatriumsalz

Die Arbeitskonzentration zur Selektion von Bakterien beträgt 50-100 mg/l.

Kanamycin-Stammlösung

100 mg/ml Kanamycinsulfat

Die Arbeitskonzentration zur Selektion von Bakterien beträgt 50 mg/l.

3-Amino-1,2,4-triazole (3-AT)-Stammlösung

1 M 3-Amino-1,2,4-triazole

In ddH₂O lösen, sterilfiltrieren und bei 4 °C einen Monat verwendbar.

Die Arbeitskonzentration im Y1H-Screening beträgt 50-100 mM.

2.2.3 Plasmidpräparation aus *E. coli*

Silica-Suspension

10 % (w/v) Siliciumdioxid (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)

Lagerung bei 4 °C,

vor der Benutzung gründlich resuspendieren.

Lösung A

50 mM Tris-HCl aus 1 M Stammlösung, pH7,5

10 mM EDTA

100 mg/l RNase A

Lagerung bei 4 °C.

Lösung B

0,2 M NaOH

0,1 % (w/v) SDS

Lösung C

1,32 M Kaliumacetat

Mit Essigsäure pH 4,8 einstellen.

Lösung D

6 M NaI

Lagerung bei 4 °C im Dunkeln.

Lösung E

50 % (v/v) Ethanol

10 mM Tris-HCl aus 1 M Stammlösung pH 7,5

100 mM NaCl

1 mM EDTA

2.2.4 Plasmidpräparation aus Hefe-Zellen

Zellsuspensionspuffer

50 mM Glucose

10 mM EDTA

25 mM Tris-HCl, pH 8,0

150 U/ml Lyticase (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)

Lagerung der Aliquote bei -20 °C.

Denaturierungslösung

0,2 M Natriumhydroxid

1 % SDS

Renaturierungslösung

3 M Kaliumacetat

Mit Essigsäure pH 4,8 einstellen.

2.2.5 Sterilisation und Aussaat von *A. thaliana*-Samen

Sterilisierlösung

3 % (v/v) Natriumhypochlorit

0,1 (v/v) Triton-X-100

In sterilem ddH₂O ansetzen, nicht autoklavieren, steril filtrieren, Lagerung bei 4 °C.

0,1 % Agaroselösung

0,1 % (w/v) Agarose

in dH₂O ansetzen, autoklavieren.

2.2.6 Transformation von *A. thaliana*

Inokulationsmedium

5 % (w/v) Saccharose

0,05 % (v/v) Silwet L-77 (Lehle Seeds, Round Rock, TX, USA)

frisch ansetzen, nicht autoklavieren.

2.2.7 Transformation von Hefe-Zellen

Lithiumacetat-Lösung

1 M Lithiumacetat

Lösung frisch ansetzen und sterilfiltrieren.

50 % PEG 3350

50 % (w/v) PEG 3350 (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)

Carrier-DNA

2 mg/ml Lachssperma-DNA (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)

Bei 4 °C in sterilem TE lösen, aliquotieren und bei -20 °C lagern

Zum Denaturieren 5 min in kochendem Wasser erhitzen, dann sofort in Eis-Wasser-Gemisch abkühlen lassen und bis zur Verwendung darin lagern.

2.2.8 Isolation und Transformation von Petersilieprotoplasten

CaCl₂-Lösung

0,24 M CaCl₂

Ca(NO₃)₂-MES-Lösung

0,275 M Ca(NO₃)₂

2 mM MES aus 100 mM Stammlösung

Mit KOH pH 6,0 einstellen.

Enzym-Lösung

0,5 % (w/v) Cellulase Onozukara R-10 (Duchefa, Haarlem, Niederlande)

1,08 % (w/v) Macerozym R-10 (Duchefa, Haarlem, Niederlande)

0,24 M CaCl₂

Frisch ansetzen, 2 h rühren und sterilfiltrieren.

PEG-Lösung

25 % (w/v) PEG 6000

100 mM Ca(NO₃)₂

45 mM Mannitol

Pep25-Lösung

100 µg/ml Pep25-Peptid

Auf Eis herstellen. Mit verdünnter KOH pH 9,0 einstellen, sterilfiltrieren und in Aliquote bei -20 °C lagern.

P5-Medium

1x Gamborg B5-Medium (Duchefa, Haarlem, Niederlande)

versetzt mit

10 ml 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure aus 0,01 % (w/v) Stammlösung

96,9 g Saccharose

Mit 1 M KOH pH 5,7 einstellen, autoklavieren und dunkel bei RT lagern.

2.2.9 Proteinbestimmung nach Bradford

Bradford-Arbeitslösung

2 ml 5xRoti®-Quant Reagenz (Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland)

5,5 ml dH₂O

Lösung frisch ansetzen.

2.2.10 Luciferase-Assays

Luciferin-Stammlösung

10 mM D-Luciferin

25 mM Glycylglycin, pH7,8

Lagerung bei -20 °C in Aliquote.

LUC-Extraktionspuffer

0,1 M NaH₂PO₄, pH 7,8

1 mM Dithiothreitol (DTT) aus 1 M Stammlösung (Lagerung bei -20 °C)

DTT frisch dazu geben.

LUC-Reaktionspuffer

15 mM MgSO₄

25 mM Glycylglycin, pH7,8

Lagerung bei -20 °C.

Unmittelbar vor Verwendung Zugabe von:

5 mM ATP, aus 100 mM Stammlösung (Lagerung bei -20 °C).

LUC-Substratlösung

0,2 mM Luciferin aus Stammlösung

25 mM Glycylglycin, pH 7,8

Unmittelbar vor Verwendung herstellen.

2.2.11 β-Glucuronidase-Assays

GUS-Extraktionspuffer

50 mM NaPO₄, pH 7

10 mM Na₂EDTA

0,1 % (v/v) Triton X-100

0,1 % (v/v) N-Laurylsarcosin

10 mM β-Mercaptoethanol

Das β-Mercaptoethanol frisch dazu geben, nicht autoklavieren und bei 4 °C lagern.

GUS-Reaktionspuffer

GUS-Extraktionspuffer versetzt mit:

1 mM 4-MUG (4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronid Dihydrat)

Lösung frisch ansetzen.

2.3 Medien

Soweit nicht anders angegeben wurden alle Medien mit dH₂O angesetzt, für 20 Min autoklaviert und bei RT gelagert. Nach dem Aufkochen von Festmedium und Abkühlen auf 50 °C wurden ggf. steriles Antibiotika, Glukoselösung oder 3-AT hinzugegeben.

2.3.1 *E. coli*

LB-Medium (1000 ml)

10 g Bacto-Trypton

5 g Hefe-Extrakt

10 g NaCl

15 g Agar (optional)

dYT-Medium (1000 ml)

16 g Bacto-Trypton

10g Hefe-Extrakt

5 g NaCl

15 g Agar (optional)

SOC-Medium (1000 ml)

20 g Bacto-Trypton

5 g Hefe-Extrakt

584 mg NaCl

186 mg KCl

2,033 g MgCl₂*6(H₂O)

2,465 g MgSO₄*7(H₂O)

Den pH-Wert 6,8-7 einstellen. Zugabe von 10 ml 2 M Glucose-Lösung (sterilfiltriert), aliquotieren und bei -20 °C lagern.

2.3.2 *S. cerevisiae*

10x Aminosäuren-Mix (Drop-Out-Mix) (1000 ml)

Zur Verwendung in Drop-Out-Medien zur Selektion von Plasmiden in Hefe, werden die gewünschten Aminosäuren aus dem untenstehenden Mix weggelassen.

200 mg L-Adenin-Hemisulfat

200 mg L-Arginin-HCl

200 mg L-Histidin-HCl Monohydrat

300 mg L-Isoleucin

1000 mg L-Leucin

300 mg L-Lysin-HCl

200 mg L-Methionin

500 mg L-Phenylalanin

2.000 mg L-Threonin

200 mg L-Tryptophan

300 mg L-Tyrosin

200 mg L-Uracil

1.500 mg L-Valin

Lagerung bei 4 °C.

SD-Medium (1000 ml)

6,7 g Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids (BD, Franklin Lakes, USA)

je 100 ml 10x Aminosäuren-Mix (bzw. Drop-Out-Mix zur Selektion)

18 g Agar (optional)

Zugabe von 950 ml dH₂O und pH 5,6 mit NaOH einstellen. Autoklavieren, Zugabe von:

50 ml 40 % Glucose-Lösung (sterilfiltriert)

2x YPAD-Medium (1000 ml)

20 g Hefeextrakt

40 g Pepton

80 mg L-Adenin Hemisulfat

18 g Agar (optional)

Zugabe von 900 ml dH₂O; autoklavieren, dann Zugabe von 100 ml 40 % Glucose-Lösung (sterilfiltriert).

YPAD-Medium (1000 ml)

10 g Hefeextrakt

20 g Pepton

80 mg L-Adenin-Hemisulfat

18 g Agar (optional)

Mit dH₂O auf 950 ml auffüllen und autoklavieren. Danach Zugabe von:

50 ml 40 % Glucose-Lösung (sterilfiltriert)

2.3.3 Petersilie-Zellkultur

Fe-EDTA-Lösung (500 ml)

2.780 mg FeSO₄*7H₂O

3.730 mg Na₂EDTA

Zugabe von 500 ml dH₂O, Lagerung bei 4 °C.

2,4-D (2,4-Dichlorphenoxyessigsäure)-Lösung (500 ml)

50 mg 2,4-D

Das 2,4-D wird in 100 %igem Ethanol gelöst (1 % des Endvolumens) und dann mit ddH₂O auf 500 ml aufgefüllt. Lagerung bei 4 °C.

Spurenelemente (100 ml)

300 mg H₃BO₃

1.120 mg MnSO₄*H₂O

300 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

25 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

39 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

25 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Zugabe von 100 ml ddH_2O , sterilfiltrieren und als Aliquote lagern.

B5-Vitamine (500 ml)

5.000 mg Myo-Inositol

50 mg Nikotinsäure

50 mg Pyridoxin-HCl

500 mg Thiamin-HCl

Zugabe von 500 ml dH_2O , sterilfiltrieren und als Aliquote bei -20°C lagern.

HA-Medium (1000 ml)

20 ml KNO_3 aus 1,236 M Stammlösung

1,14 ml $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ aus 0,582 M Stammlösung

2 ml $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ aus 0,507 M Stammlösung

2 ml $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ aus 0,507 M Stammlösung

2 ml $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ aus 0,543 M Stammlösung

1 ml KI aus 2,25 mM Stammlösung

2,5 ml Fe-EDTA aus Fe-EDTA Lösung (s.o.)

1 ml Spurenelemente aus Stammlösung (s.o.)

10 ml B5-Vitamine aus Stammlösung (s.o.)

10 ml 2,4-D aus Stammlösung (s.o.)

20 g Saccharose

In ddH_2O auf ca. 700 ml auffüllen, pH 5,5 mit KOH/HCl einstellen. Auf 1.000 ml mit ddH_2O auffüllen. In 40 ml Portionen in 200 ml Erlenmeyer-Kolben autoklavieren (20 min, 121°C). Sofort nach der Sterilisation aus dem Autoklaven nehmen, auf Raumtemperatur abkühlen und dunkel lagern.

2.4 Bakterien-, Hefe- und Pilz-Stämme

Agrobacterium tumefaciens

Für Transformationszwecke ist der nicht onkogene *A. tumefaciens*-Stamm C58C1 verwendet worden (Deblaere *et al.*, 1985), welcher das entwaffnete Ti-Plasmid pGV2260 besitzt. Die Selektion erfolgt auf Carbenicillin (50 mg/l) und Rifampicin (50 mg/l).

Botrytis cinerea

Der Laborstamm *Botrytis cinerea* B05.10 wurde von Paul Tudzynski (Universität Münster) zur Verfügung gestellt.

Escherichia coli

Für Klonierungsarbeiten sind die *E. coli*-Stämme XL1 Blue MRF' (Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland), INVαF' und TOP10 (beide Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) verwendet worden.

Pseudomonas syringae pv. *tomato*

Die in dieser Arbeit verwendeten *P. syringae* pv. *tomato*-Stämme beruhen auf dem Isolat *P. syringae* pv. *tomato* DC3000. Diese tragen eine natürliche Rifampicin-Resistenz und eine durch den Expressionsvektor pVSP61 vermittelte Kanamycin-Resistenz. Während der virulente Stamm nur den leeren Vektor pVSP61empty trägt (Pto DC3000 pVSPempty), exprimiert der avirulente Stamm das Avirulenzgen *avrRPM1* (Pto DC3000 *avrRPM1*). Dieses wird durch das Resistenzgen *RPM1* in *A. thaliana* Col-0 erkannt (Dangl *et al.*, 1992). Beide Stämme wurden von Dr. Jane Parker (Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung, Köln) zur Verfügung gestellt.

Saccharomyces cerevisiae

Für die Durchführung des Y1H-Screenings ist der *S. cerevisiae*-Stamm Y1HGold (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) verwendet worden.

2.5 Pflanzenmaterial

Arabidopsis thaliana

Es wurde *Arabidopsis thaliana*-Ökotyp Columbia (Col-0) verwendet. Samen dieses Ökotyps lagen bereits im Labor vor (R. Hehl, pers. Mitteilung).

Petroselinum crispum Zellkultur

Für die Isolation und Transformation von Petersilie-Protoplasten (2.11.23) wurde die Kallus-Kultur Pc 5/3 von *Petroselinum crispum* verwendet (zur Verfügung gestellt von Imre Somssich, Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung, Köln). Im Abschnitt 2.3.3 ist die Kultivierung der Zellkultur aufgeführt.

2.6 Oligonukleotide und Peptide

Primer und Oligonukleotide für PCR-Anwendungen bzw. Klonierungen wurden bei Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) oder Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Sie wurden mit der Angabe ‚desalted‘ bestellt, zu einer Konzentration von 100 pmol/μl in LTE-Puffer gelöst. Zur Verwendung einer PCR sind die Primer jeweils 1:5 mit ddH₂O verdünnt und bei -20 °C gelagert worden.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide und Primer sind im Anhang 8.2 aufgeführt.

Das Peptid Pep25 mit der Aminosäuresequenz DVTAGAEVWNQPVRGFKVYEQTEMT ist bei SeqLab (Göttingen, Deutschland) synthetisiert worden.

2.7 Vektoren

Die aufgeführten Plasmide sind in dieser Arbeit verwendet worden. Die dazugehörigen Labornummern sind in der Materialliste im Anhang zu entnehmen.

pBT10GUS-d35SLUC: Derivat des pBT10GUS-Vektors, das ein konstitutiv exprimiertes LUC-Gen trägt (Koschmann *et al.*, 2012).

27G-8 M1S1-pBT10GUS-d35SLUC, 20u M1S1-pBT10GUS-d35SLUC und 4xD-pBT10GUS-d35SLUC sind Derivate dieses Vektors und tragen die *cis*-Sequenzen 27G-8_M1S1 (Sequenz 15), 20u_M1S1 (Sequenz 2) und 4xD als Tetramere zwischen den *SpeI/XbaI*-Schnittstellen (vgl. Koschmann *et al.* (2012)).

pBT10GUS: Vektor zur Erstellung von Promotor-GUS-Konstrukten (Sprenger-Haussels und Weisshaar, 2000).

pCR2.1: Klonierungsvektor (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland)

pGPTV-bar: T-DNA-Vektor mit GUS-Reportergen und Phosphinotricin-Resistenzgen zur Selektion transgener Pflanzen (Becker *et al.*, 1992).

pHis2.1: Bait-Vektor für Yeast One-Hybrid-Screenings (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich).

pORE-O2-d35S-pA: T-DNA-Vektor mit Kanamycin-Resistenzgen für die Expression der Transkriptionsfaktoren in Protoplasten bzw. für die Erstellung transgener Überexpressionspflanzen. Derivat des T-DNA-Vektors pORE-O2 (Coutu *et al.*, 2007), modifiziert durch Machens *et al* (2014).

pRT101-LUC: Reportergenvektor mit konstitutiv exprimiertem LUC-Gen (Maas *et al.*, 1991).

2.8 Kits

Für die Arbeiten mit DNA (Klonierung, Aufreinigung, Plasmidisolation) wurden folgende Kits verwendet:

- EasyPrep Pro Plasmid Miniprep (Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland)
- NucleoBond Xtra Midi EF (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)
- NucleoBond Xtra Maxi (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)
- NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)
- NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)
- RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)
- TA Cloning Kit with pCR 2.1 Vector (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland)

2.9 Sonstige Materialien

In dieser Arbeit verwendete Plastikmaterialien (wie z.B. Petrischalen, Spitzen, Eppendorfgefäße, Falconröhrchen, Küvetten, Pasteurpipetten) sind von der Firma Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht) bezogen worden.

2.10 Technische Geräte

Neben den üblichen Laborzentrifugen, Inkubatoren, Vortexer und Sterilbänke kamen die folgenden Geräte zum Einsatz:

- Elektroporator, Gene Pulser II', Bio-Rad Laboratories GmbH
- Gel-Dokumentationsgerät, Geldoc XR, Bio-Rad Laboratories, Inc
- Gelelektrophoreseapparaturen, Biozym
- Lichtschrank, CU-32L und CU-36L/4, Percival Scientific
- Mikrotiterplatten-Leser, TriStar LB 941, Berthold Technologies
- Nano PhotometerTM (7122V1.6.1), Implen GmbH
- PCR-Thermocycler, Mastercycler, Eppendorf AG
- Photometer, Ultrospec 2000 UV/Visible Spectrophotometer, Pharmacia Biotech

- Vakuumpumpe, High Vacuum Pump E1M5, Edwards
- Elektroporator ‚Gene Pulser II‘, Bio-Rad Laboratories
- Thomakammer, Roth

2.11 Methoden

2.11.1 Fertigstellung und Bearbeitung von DNA-Konstrukten

In dieser Arbeit ist für die Fertigstellung oder Bearbeitung von DNA-Molekülen, wenn nicht anders vom Hersteller angegeben, nach Standardprotokollen (Sambrook und Russwell, 2001) gearbeitet worden.

2.11.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur Vervielfältigung von ausgewählten DNA-Sequenzen, wie zum Beispiel cDNAs oder genomischer DNA, wurde eine 25 µl oder 50 µl PCR-Reaktion in einem 0.2 ml Reaktionsgefäß durchgeführt. Je nach Hersteller bzw. Anwendung variieren PCR-Puffer und Polymerase. Es wurde sich an die Herstellerangaben gehalten. Bei einer Kolonie-PCR aus *E. coli* wurde mittels gelber Pipettenspitze etwas von der zu untersuchenden Kolonie entnommen und in die PCR-Reaktion resuspendiert. Eine Polymerasen-Ketten-Reaktion setzte sich aus folgenden Komponenten auseinander:

<u>Volumen</u>	<u>Komponente</u>	<u>Konzentration</u>
X µl	PCR-Puffer	(10x)
2 µl	dNTP-Mix	(10 mM; 2,5 mM pro dNTP)
1 µl	Primer 1	(20 µM)
1 µl	Primer 2	(20 µM)
1 µl	Template DNA	(0,1-1 ng Plasmid, 0,1-1 µg gDNA) oder Kolonie
0,25 µl	Polymerase	(5 U/ µl)
x µl	ddH ₂ O	
x µl	Endvolumen	

Das Programm zur Vervielfältigung der DNA lautet wie folgt:

<u>Schritt:</u>	<u>Temperatur:</u>	<u>Zeit:</u>	
1.) Lange Denaturierung	95 °C	3 min	
2.) Kurze Denaturierung	95 °C	30 sec	
3.) Primer Annealing	55 °C	30 sec *	x35
4.) Elongation	72 °C	1 min **	
5.) Finale Elongation	72 °C	2-5 min	
6.) Kühlung	4 °C	∞	

*Die Annealing Temperatur richtet sich nach der Zusammensetzung und Länge der verwendeten Primer.

**Die Elongationszeit variiert je nach Größe des zu amplifizierenden Templates und nach der in der PCR verwendeten Polymerase.

Bei PCR-Reaktionen, in denen eine hohe Amplifikationsgenauigkeit erwünscht war, wie z.B. bei Klonierungen, ist die PqGold PWO-DNA-Polymerase (PEQLAB, Erlangen, Deutschland) verwendet worden. Diese besitzt eine proofreading Aktivität, was die fehlerhafte Amplifikation deutlich verringert.

Für die Analyse der Reaktion wurde entweder ein Teil oder die gesamte Probe Gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Aufreinigung erfolgte mittels „NucleoSpin Gel and PCR Clean-up“ Kit (Macherey Nagel, Düren, Deutschland) nach Herstellerangaben.

2.11.2.1 Hefe-Kolonie PCR

Für eine Amplifikation der Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae* wurde eine Hefe-Kolonie PCR durchgeführt. Hierfür wurden zunächst folgende Substanzen zusammen gegeben:

<u>Volumen</u>	<u>Komponente</u>	<u>Konzentration</u>
2,5 µl	PCR-Puffer	(10x)
2,5 µl	dNTP-Mix	(10 mM; 2,5 mM pro dNTP)
0,5 µl	Primer 1	(100 µM)
0,5 µl	Primer 2	(100 µM)
0,5 µl	Polymerase	(5 U/µl)
18,5 µl	ddH ₂ O	
25 µl	Endvolumen	

Zu den einzelnen Reaktionen wurde eine sehr kleine Menge der zu untersuchenden Hefe-Kolonie gegeben. Die einzelnen Schritte des PCR-Programmes lauten wie folgt:

<u>Schritt:</u>	<u>Temperatur:</u>	<u>Zeit:</u>	
1.) Lange Denaturierung	95 °C	5 min	
2.) Kurze Denaturierung	95 °C	30 sec	
3.) Primer Annealing	55 °C	30 sec *	x30
4.) Elongation	72 °C	1 min **	
5.) Finale Elongation	72 °C	5 min	
6.) Kühlung	4 °C	∞	

*Die Annealing Temperatur richtet sich nach der Zusammensetzung und Länge der verwendeten Primer.

**Die Elongationszeit variiert je nach Größe des zu amplifizierenden Templates und nach der in der PCR verwendeten Polymerase.

Es wurden 5 µl der PCR-Probe auf einem Agarosegel untersucht.

2.11.3 RNA-Isolation aus *A. thaliana*

Für die Isolation von *Arabidopsis*-RNA wurde das „NucleoSpin RNA Plant“ Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) nach Herstellervorgaben verwendet. Die Kontrolle der Quantität und Qualität der RNA erfolgte mittels photometrischer Messung (2.11.8) und Gelelektrophorese (2.2.1).

2.11.4 Reverse Transkription

Nach der Isolation von RNA (2.11.3) erfolgt die Reverse Transkription von RNA in cDNA. Dies wurde mit dem „RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis“ Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) durchgeführt, wobei der mitgelieferte Oligo(dT) Primer verwendet wurde. Die entstandene Erststrang-cDNA wurde entweder direkt in eine PCR eingesetzt (2.11.2) oder bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.11.5 Annealing von Oligonukleotiden

Um einzelsträngige, komplementäre Oligonukleotide zu annealen sind die Moleküle in einem Verhältnis von 1:1 vermengt worden. Dabei lagen sie beide jeweils in einer Konzentration von 100 µm vor. In der PCR-Maschine sind die Proben zuerst für 1 Minute auf 95 °C erhitzt worden und wurden danach pro Minute um ein Grad bis auf Raumtemperatur herunter gekühlt.

2.11.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe wurde in dieser Arbeit mittels gelelektrophoretischer Auftrennung durchgeführt. Hierbei musste zunächst ein Agarosegel mit einer Konzentration zwischen 0,7-2 % (w/v) hergestellt werden. Hierfür wurde die Agarose in der Mikrowelle in 1xTAE gelöst und mit Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) versetzt. Das Verhältnis entsprach dabei 1/10.000. Nachdem das Gel in einem Gelträger gegossen, mit einem Kamm versehen und ausgehärtet war, wurde es in die mit 1xTEA befüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die mit Ladepuffer beschwerten Proben wurden in die Geltaschen befüllt und bei 6-8 V / 7 cm aufgetrennt. Zusätzlich ist ein Größenstandard (GeneRuler 1 kb DNA Ladder bzw. MassRuler Low Range DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) aufgetragen worden, um die Größe der Fragmente ermitteln zu können. Mit Hilfe des Geldokumentationsgerätes wurde das Agarosegel unter dem UV-Licht fotografiert.

2.11.7 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Das „NucleoSpin Gel and PCR Clean-up“ –Kit (Macherey Nagel, Düren, Deutschland) wurde zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen oder aus PCR-Reaktionen verwendet. Es wurde nach Herstellerangaben gearbeitet.

2.11.8 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Um die Konzentration von DNA bestimmen zu können, wurde ein Nano Photometer (Implen, München, Deutschland) verwendet. Zuerst wurde mit dem DNA-Lösungsmittel der Nullwert bei der OD260 festgelegt. Hierfür wurde von 3-5 µl der zu untersuchenden DNA-Lösung ein UV-Absorptionsspektrum aufgenommen, wobei sich aus der OD260 die Konzentration ermitteln lässt. Eine DNA- OD260 von 1 entspricht 50 µg/ml dsDNA und 20 µg/ml Oligonukleotid. Mittels des Verhältnisses von OD260/OD280 lassen sich Proteinverunreinigungen feststellen. Der Wert einer sauberen DNA sollte größer als 1,8 sein. Das Verhältnis von OD260/OD230 zeigt Verunreinigungen wie z.B. durch Phenol und Guanidin-HCl an und es sollte größer als 2,0 sein.

2.11.9 Herstellung und Transformation elektrokompeter Zellen

Für die Erstellung von elektrokompeter Zellen sind 5 ml dYT-Medium mit einer Einzelkolonie von *E. coli* XL1 Blue MFR' angeimpft und über Nacht auf dem Schüttler bei 37 °C inkubiert worden. Am nächsten Tag wurde die gesamte Kultur in 500 ml dYT überführt

und bei 37 °C bis zu einer OD600 von 0,5 bis 0,8 unter schütteln inkubiert. Die Kultur ist daraufhin 30 Minuten auf Eis inkubiert und im Folgenden bei 400 x g und 4 °C für 30 min zentrifugiert worden. Der Überstand wurde abdekantiert und das Pellet in 500 ml eiskaltem 10 % Glycerin resuspendiert. Dieser Schritt ist mit 250 ml und 10 ml 10 % Glycerin wiederholt worden. Das Pellet wird zum Schluss in 1 ml eiskaltem 10 % Glycerin resuspendiert und als 50 µl Aliquoten in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Für die Transformation von DNA, z.B. in Form eines Ligationsansatzes, sind 50 µl kompetente *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut. Von dem Ligationsansatz sind 2 µl entnommen und zu den Zellen gegeben worden. Danach erfolgte eine Inkubation von 5 Minuten auf Eis. Der gesamte Ansatz wurde in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben und bei 2,5 kV, 200 Ohm und 25 µF elektroporiert. Unmittelbar nach diesem Schritt wurden 500 µl SOC-Medium zugegeben und resuspendiert. Der Transformationsansatz wurde für 30 Minuten unter schütteln bei 37 °C inkubiert. Verschiedene Volumina sind auf Platten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert worden.

2.11.10 Plasmidpräparation aus *E. coli*

Für die Präparation von größeren Mengen DNA, wie z.B. für die Verwendung bei der Transformation von Petersilien-Protoplasten, wurde das Kit „NucleoBond Xtra Midi EF“ oder „NucleoBond Xtra Maxi“ (beides von Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) verwendet. Bei der Isolierung von DNA in kleineren Mengen und größerer Reinheit, wie z.B. für eine Sequenzierung, wurde das „EasyPrep Pro Plasmid Miniprep“-Kit (Biozym) genutzt. Bei allen anderen Plasmidpräparationen wurde ein Protokoll mit eigens angesetzter Lösung verwendet.

Hierfür wurde am Vortag eine 3-5 ml Vorkultur (LB- Medium mit entsprechendem Antibiotikum) von dem zu isolierendem Klon angeimpft. Diese wurde bei 37 °C unter Schütteln über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde 1,5 ml dieser Kultur entnommen und in einem Eppendorfgefäß abzentrifugiert (15.000 g, 1 min). Nachdem der Überstand entfernt wurde, ist das Pellet in 100 µl Lösung A resuspendiert worden. Es erfolgte durch Zugabe von 100 µl der Lösung B und 5 maligem invertieren die Lyse der Zellen, wobei diese nach 2 min durch die Zugabe von Lösung C neutralisiert worden ist. Bei diesem Schritt sollte auch drei Mal vorsichtig invertiert werden. Die Zelltrümmer und die genomische DNA wurden als nächstes in einem Zentrifugationsschritt entfernt (5 min, 15.000 g). Der Überstand wurde mit 500 µl Lösung D und zusätzlich mit 20 µl Silica-Suspension vermengt. Da in diesem Schritt die DNA-Bindung an die Silica-Partikel erfolgte, wurde in diesem Schritt 10 Sekunden

gevorwext und die Suspension danach 5 Minuten bei RT inkubiert. Die Partikel wurden durch Zentrifugation (15.000 g, 10 s) pelletiert und der Überstand verworfen. Durch die Resuspension des Pellets in 500 µl Lösung E wurden die Silica-Partikel von Proteinresten befreit. Dieser Waschriss ist zwei Mal durchgeführt worden. Nachdem die Waschlösung vollständig durch abpipettiert entfernt worden war, wurde das Pellet zusätzlich für 3 Minuten bei RT getrocknet. Das Pellet konnte daraufhin in 40 µl ddH₂O aufgenommen und resuspendiert werden. Es erfolgte eine Inkubation von 2 min bei 70 °C, wodurch die Plasmid-DNA von den Silica-Partikeln gelöst wurde. Als letztes wurde durch einen finalen Zentrifugationsschritt (15000 g, 2 min) der plasmidhaltige Überstand vom Silica-Pellet getrennt und bis auf 4 µl abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Konzentration der mit dieser Methode isolierten Plasmid-DNA lag typischerweise bei etwa 100-200 ng/µl.

2.11.11 Plasmidpräparation aus *S. cerevisiae*

Um eine kleinere Menge an Plasmid-DNA aus Hefe zu isolieren wurde die Methode der alkalischen Lyse angewendet. Hierzu wurde eine Hefekolonie von der Platte in 100 µl Zellsuspensionspuffer A resuspendiert und für 60 min bei 37 °C inkubiert. Das Reaktionsgefäß wurde dabei alle 10 min invertiert. Nach Zugabe von 200 µl Denaturierungslösung B wurde durch mehrmaliges Invertieren gemischt und zur Lyse der Zellen 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 150 µl Renaturierungslösung C hinzugefügt, vorsichtig gemischt und erneut für 5 min auf Eis inkubiert. Zur Trennung der genomische DNA sowie der Zelltrümmer von dem plasmidhaltigen Überstand ist für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert worden. Anschließend wurde die wässrige Phase abgenommen und die darin gelöste DNA mit einem zweifachen Volumen Ethanol gefällt. Hierzu sollte die DNA mindestens für 15 min bei -20 °C inkubiert werden. Nach einer Zentrifugation bei 13.000 rpm für 15 min wurde das entstandene Pellet zwei Mal mit je 200 µl Ethanol gewaschen. Hierzu ist bei 23.000 rpm für 5 min zentrifugiert worden. Nachdem das Ethanol abpipettiert und an der Luft getrocknet wurde, folgte die Lösung der DNA in 15 µl LTE. Die isolierte Plasmid-DNA ist sehr niedrig konzentriert und wurde zur Amplifikation unverdünnt direkt für eine PCR verwendet. Falls eine höhere Konzentration erwünscht war, erfolgte eine Retransformation der DNA in *E. coli*.

2.11.12 Sequenzierung von DNA-Molekülen

Um die Richtigkeit von klonierten Sequenzen zu überprüfen oder um amplifizierte cDNA der Klone im Y1H-Screen zu analysieren, wurden diese nach Sanger durch GATC Biotech (Konstanz, Deutschland) sequenziert. Die digital übermittelten Daten wurden mit der Software CLC Main Workbench (CLC Bio, Aarhus, Dänemark) ausgewertet.

2.11.13 Sequenzanalysen

Zur Analyse und Verarbeitung von DNA- und Proteinsequenzen wurde die kommerzielle Software CLC Main Workbench (CLC bio, Aarhus, Dänemark) verwendet. Bezogen wurden DNA- und Proteinsequenzen über www.arabidopsis.org oder www.ncbi.nlm.nih.gov.

2.11.14 Erstellung von Dauerkulturen

Bei der Erstellung von Dauerkulturen von *E. coli* wurden 700 µl einer gut bewachsenen LB-Flüssigkultur in entsprechendem Antibiotika mit 300 µl Glycerin vermengt und bei -80 °C tiefgefroren und gelagert.

Für die Fertigstellung von Hefe-Dauerkulturen wurde eine frische Kolonie des entsprechenden Stammes von einer Platte in 500 µl YPAD + 25 % Glycerin (v/v) aufgenommen, resuspendiert und bei -80 °C eingefroren und gelagert.

2.11.15 Klonierung von Reportergenkonstrukten für die Protoplasten-Transfektion

Bei der Klonierung von neuen Reportergenkonstrukten, welche zur Transformation von Petersilien-Protoplasten dienen, wurden der Vektor pBT10GUS-d35SLUC (Koschmann *et al.*, 2012) verwendet. Hierfür sind einzelsträngige Oligonukleotide annealt (2.11.5) und anschließend phosphoryliert worden (2.11.1). Die entstandenen *SpeI*- bzw. *SacI*-Überhänge wurden für die Ligation in den zuvor mit *SpeI*/*SacI* geschnittenen und dephosphorylierten pBT10GUS-d35SLUC-Vektor ligiert. Zur weiteren Tetramerisierung wurden nur Klone verwendet, welche das Insert in der richtigen Orientierung und mit korrekter Sequenz enthielten. Das Plasmid wurde daraufhin präpariert (2.11.10), durch zwei unterschiedliche Restriktionsansätze gespalten und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Aus einer *SacI*/*SpeI*-Spaltung wurde jeweils das 2 kb-Fragment und aus der *XbaI*/*SacI*-Spaltung das 5 kb-Fragment aufgereinigt. Bei der Ligation dieser beiden Fragmente wurde der pBT10GUS-d35SLUC-Vektor dadurch wieder hergestellt, nur dass er jetzt das Insert als Dimer trägt. Dieser Vorgang wurde mit dem entstandenen Dimer wiederholt, was zur Tetramerisierung

des Inserts geführt hat. Nachdem die Sequenz durch eine Sequenzierung (2.11.12) überprüft worden ist, sind die entstandenen Konstrukte für die Transformation von Petersilien-Protoplasten genutzt worden.

2.11.15.1 Erstellung der Kombinationselemente

Die für die Kombinationsanalyse verwendeten Konstrukte wurden, wie die homologen Tetramere im Kapitel 2.11.15, mittels Tetramerisierung in den Vektor pBT10GUS-d35SLUC kloniert. Jedoch wurden die unterschiedlichen Sequenzen im jeweiligen Ligationsansatz miteinander kombiniert.

2.11.16 Klonierung von Reportergenkonstrukten zur nativen Promotoranalyse

Um das zu untersuchende *cis*-Element im nativen Promoter genauer zu analysieren wurden verschieden Promotorfragmente in den pBT10GUSLUC-Vektor kloniert. Hierfür musste jedoch der enthaltene Minimalpromoter vor dem Reportergen entfernt werden. Für die Amplifikation der Promotorfragmente wurde zunächst die genomische DNA von *A. thaliana* isoliert (NucleoSpin® Plant II; Macherey-Nagel, Düren, Deutschland), welche als Template in der PCR fungierte. Abhängig von der Fragmentgröße wurden verschiedene Forward-Primer upstream des Translationsstartes verwendet. Für alle Reaktionen konnte derselbe Reverse-Primer (GUS75), welcher direkt vor dem Translationsstart endet, genutzt werden (Anhang 8.2). Mit Hilfe der Primer wurden für die Klonierung Restriktionsschnittstellen in das Fragment eingefügt. Bei dem Forward-Primer handelte es sich um eine *SpeI*- und bei dem Reverse-Primer um eine *XhoI*-Restriktionsschnittstelle. Die PCR wurde mittels Proofreading-Polymerase durchgeführt. Der Vektor wurde zunächst vollständig mit *SpeI* gespalten und anschließend dephosphoryliert. Da der pBT10GUS-d35SLUC-Vektor zwei *XhoI*-Schnittstellen besitzt (Positionen 2706; 4786), war eine partielle Spaltung des Plasmides notwendig. Ziel war es, nur die Schnittstelle an der Position 4786 zu spalten, sodass der Minimalpromotor entfernt wurde. Durch die gelelektrophoretische Auftrennung konnten die verschiedenen Vektorfragmente voneinander getrennt werden. Nach der Aufreinigung der ca. 6900 bp großen Bande konnte das zuvor gespaltene und mittels Phenol-Chloroform aufgereinigte PCR-Produkt in den Vektor kloniert werden. Bei der Ligation musste die doppelte Menge an geschnittenem Vektor eingesetzt werden, da sich hier auch nur mit *SpeI* geschnittene Vektorfragmente befanden (da der Größenunterschied zu gering ist). Die Überprüfung der Klone geschah mittels Kolonie-PCR unter der Verwendung des GUS75- und dem jeweiligen Forward-Primer. Nachdem die Klone durch Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft wurden (2.11.12), wurden Dauerkulturen von diesen erstellt (2.11.14).

2.11.17 Klonierung von Reportergenkonstrukten für Yeast One-Hybrid-Screenings

Um Sequenzen im Yeast One-Hybrid System untersuchen zu können, mussten sie zunächst im Vektor pHis2.1 kloniert werden. Hierfür wurden diese aus dem pBT10GUS-d35SLUC-Vektor mit integrierter *cis*-Sequenz amplifiziert. Dies geschah mittels Proofreading-Polymerase und den Primern Bait_right und GUSLUC Bait_left GUSLUC, welche eine *EcoRI* und *SacI*-Schnittstelle in das Fragment einbauen. Nachdem das Fragment gespalten wurde, konnte es in den entsprechend geschnittenen pHis2.1-Vektor kloniert werden. Die Überprüfung des Konstruktes erfolgte mittels einer Sequenzierung (2.11.12).

2.11.18 Klonierung von Transkriptionsfaktoren in den Klonierungsvektor pCR2.1

Für die Klonierung der cDNA eines Transkriptionsfaktors z.B. in einen Expressionsvektor, ist es von Vorteil diese zuvor in einen Klonierungsvektor zu bringen. Hierfür musste die cDNA vorher mittels speziell für den Transkriptionsfaktor designten Primern amplifiziert werden. Dies geschah auf zwei unterschiedlichen Wegen. Falls die cDNA des Prey-Plasmids der cDNA-Library die korrekte Sequenz enthält (Mitsuda *et al.*, 2010), diente dies als Template. Hierbei wurde mittels des Revers-Primers das Stopp-Codon angefügt, da dies nicht in der cDNA des Prey-Plasmids enthalten war.

Falls die cDNA inkorrekt in dem Prey-Plasmid enthalten war, wurde eine andere Methode gewählt. Zunächst wurde die RNA aus *Arabidopsis Col-0* Pflanzen isoliert und mittels einer RT-Reaktion (2.11.4) die cDNA amplifiziert. Diese cDNA wurde in einer PCR mit Proofreading-Polymerase eingesetzt um sie weiter zu amplifizieren.

In beiden Wegen wurden mittels Primer die Schnittstellen für die jeweilige Subklonierung eingefügt. Sie wurden individuell gewählt, da sie aus Klonierungszwecken nicht in der jeweiligen cDNA vorkommen durften. Nachdem das die cDNA als Amplifikat vorlag, wurde es mittels „TA Cloning“ Kit (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) in den pCR2.1-Vektor kloniert. Nachdem der jeweilige Klon durch eine Sequenzierung verifiziert werden konnte, ist die Subklonierung in einen anderen Vektor vorgenommen worden.

2.11.19 Klonierung von T-DNA-Konstrukten zur Überexpression von Transkriptionsfaktoren

Für die Erstellung eines Vektors, welcher im pflanzlichen System Transkriptionsfaktoren überexprimieren kann, wurde der von Fabian Machens erstellte T-DNA-Vektor pORE-O2-d35S-pA Vektor (modifiziert aus Coutu *et al.*, 2007) verwendet (Machens *et al.*, 2014).

ORA59-pORE-O2-d35S-pA

Zur Subklonierung von ORA59 wurde die ORA59-cDNA aus dem entsprechenden pCR2.1-Konstrukt mit *EcoRI/XbaI* geschnitten und die cDNA in die ebenfalls *EcoRI/XbaI* geschnittenen pORE-O2-d35S-pA-Vektor ligiert.

ERF10-pORE-O2-d35S-pA

Mittels *EcoRI/XbaI* wurde aus dem Erf10-pCR2.1 die ERF10-cDNA geschnitten und anschließend in den ebenfalls mit *EcoRI/XbaI*-vorgeschnittenen pORE-O2-d35S-pA-Vektor kloniert.

2.11.20 Transformation von *S. cerevisiae*

Bei der Transformation von Hefe-Zellen wurde nach Gietz & Schiestl (Gietz und Schiestl, 2007) in modifizierter Form vorgegangen. Hierfür wurde zuerst der Hefe-Stamm auf eine Platte mit entsprechendem Medium (z.B. YPDA, SD Drop-Out-Medium) ausgestrichen und für 3-5 Tage bei 30 °C inkubiert. Danach wurde eine große Einzelkolonie von der Platte in flüssiges Medium überführt, resuspendiert und über Nacht bei 30°C geschüttelt (150-200 rpm). Mit Hilfe einer Thomakammer wurde die Zelldichte bestimmt damit $2,5 \times 10^8$ Zellen zu 50 ml vorgewärmten 2xYPDA-Medium gegeben werden konnte. Unter Schütteln (150-200 rpm) wurden die Hefe-Zellen bis zu einer Zelldichte von 2×10^7 je ml inkubiert, was ungefähr 4-5 Stunden in Anspruch nahm. Die Zellen wurden in der Zentrifuge für 5 min bei 3.000 g pelletiert und anschließend in 25 ml sterilem ddH₂O resuspendiert. Nachdem die Hefen wie zuvor herunter zentrifugiert wurden, wurde das Pellet ein zweites Mal wie angegeben mit Wasser gewaschen. Das Zell-Pellet ist in 1 ml ddH₂O suspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt worden. Es folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt (30 s, 13.000 g) und der so erhaltene Überstand wurde entfernt. Nach der Zugabe von 1 ml sterilem ddH₂O wurden die Hefen erneut resuspendiert. Die Zellen konnten durch diesen Schritt auf genau 1 ml gebracht werden und für jede geplante Transformation 100 µl in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben werden. Diese Zellen wurden pelletiert (30 s, 13.000 g) und der Überstand vollständig abpipettiert, damit folgende Komponenten in aufgeführter Reihenfolge auf das Pellet gegeben werden konnten:

<u>Volumen:</u>	<u>Lösung:</u>
240 µl	50 % (w/v) PEG 3350
36 µl	1 M Lithiumacetat, pH 7
50 µl	Aufgekochte ss-Carrier-DNA (2 mg/ml)
34 µl	Plasmid-DNA (0,1-1 µg) plus H ₂ O *
360 µl	Endvolumen

Nach der Zugabe wurde 30 sec gründlich gevortext. Es folgte ein Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad für 40 min. Bei 13.000 g wurden die Hefe-Zellen herunter zentrifugiert und wieder in 1 ml sterilem ddH₂O aufgenommen. Die Zellen wurden auf geeignetem Selektionsmedium plattiert (20-200 µl) oder, falls eine erhöhte Ausbeute erwünscht war (wie z.B. bei einem Y1H-Screen), nochmals für 90 min bei 30 °C in 1 ml 2xYPDA unter Schütteln inkubiert. Die Inkubation der Platten folgte für 3-5 Tagen bei 30 °C.

2.11.21 Yeast One-Hybrid-Screening

Zur Identifikation von Transkriptionsfaktoren aus *A. thaliana*, welche potentiell mit *cis*-Sequenzen interagieren, wurden Yeast One-Hybrid (Y1H) -Screenings durchgeführt. Hierbei wurde ein Bait-Konstrukt erstellt, welches ein Reportergenkonstrukt unter der Kontrolle des zu untersuchenden *cis*-Elementes enthält. Dieses Bait-Konstrukt wurde in den Y1H-Gold Stamm transformiert, wodurch ein Bait-Stamm entsteht. Nachdem dessen Hintergrundaktivität analysiert wurde, konnte eine Transformation einer cDNA-Bank erfolgen. Diese enthält ca. 1500 *Arabidopsis*-Transkriptionsfaktoren als Gal4-AD-Fusionen im Prey-Vektor pDEST_GAD424-Vektor (Mitsuda *et al.*, 2010). Nach erfolgreicher Transformation, wurden die positiven Klone mit Hilfe der PCR und anschließend mittels Sequenzierung analysiert.

2.11.21.1 Erstellung und Analyse des Bait-Stammes

Das wie im Kapitel 2.11.17 erstellte Bait-Konstrukt ist in den Y1H-Gold Stamm (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) transformiert worden (2.11.20). Um die Hintergrundaktivität des erstellten Stammes zu analysieren wurden zwei Klone dieses Stammes auf passendem Selektionsmedium, in welchem zusätzlich Histidin fehlte, ausgebracht. Zudem wurde das Wachstum hinsichtlich verschiedener 3-AT-Konzentrationen (3-Amino-1,2,4-triazol; 50 mM, 100 mM) untersucht. Je eine Kolonie der Hefezellen wurde zunächst in 1 ml sterilem ddH₂O resuspendiert und Verdünnungen von 10⁻²-10⁻⁴ erstellt. Von diesen Verdünnungen wurden jeweils 10 µl auf die unterschiedlichen Selektionsplatten getropft (Abbildung 5).

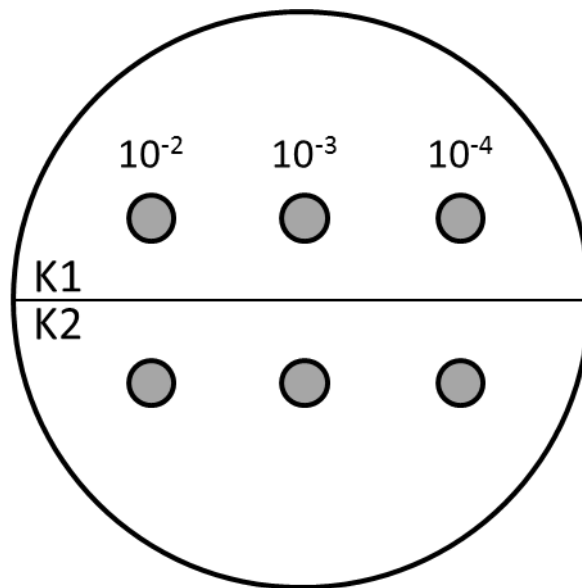


Abbildung 5: Tropfschema der 3-AT-Analyse des Bait-Stammes

K1=Klon 1; K2=Klon 2; 10^{-2} - 10^{-4} = Verdünnungen des jeweiligen Klon.

Nachdem die Platten an der Luft getrocknet waren, wurden sie für 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Anhand des Wachstums der Zellen auf der jeweiligen 3-AT-Konzentration kann die Konzentration zur Inhibierung des Hintergrundes ermittelt werden. Diese konnte im Screening verwendet werden.

2.11.21.2 Screening der cDNA-Bank

Der zu untersuchende Bait-Stamm wird in 20 einzelnen Transformationen mit der Plasmid-DNA der Bank (Mitsuda *et al.*, 2010) transformiert, wobei jede Transformation 500 ng DNA enthielt. Die Durchführung erfolgte wie im Kapitel 2.11.20 beschrieben. Jedoch sind die Zellen nach dem Hitzeschock nicht in ddH₂O, sondern in 2xYPDA aufgenommen und vereinigt worden. Es folgte ein Inkubationsschritt bei 30 °C und 180 rpm für 90 Minuten. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen pelletiert (5 min, 3000 rpm) und anschließend in 25 ml sterilem ddH₂O resuspediert. Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurde je zwei Mal 10 µl und 20 µl der Zellen auf SD –Trp/Leu Selektionsmedium plattiert. Somit wurde bei diesen Platten nur auf die beiden Plasmide selektiert (Prey-Plasmid=Leu; Bait-Plasmid=Trp) und nicht auf die Interaktion zwischen den Transkriptionsfaktoren und der Sequenz im Bait Stamm. Die übrigen Zellen wurden auf SD –Trp/Leu/His + 3-AT Platten selektiert. Hierfür wurden je 500 µl der Suspension auf eine große Platte (150 mm Durchmesser) plattiert. Bei diesen Platten wird zu der Selektion der Plasmide noch auf die Expression des Reporters hin selektiert.

Die Inkubation der Platten erfolgte bei 30 °C für 3-4 Tage. Das Wachstum der Zellen wurde jeden Tag kontrolliert und schnell wachsende Kolonien markiert. Diese wurden bevorzugt für weitere Analysen verwendet.

Nach erfolgreicher Inkubation wurden die markierten Klone auf frisches Selektionsmedium überimpft. Diese Platten wurden erneut bei 30 °C für 2 Tage inkubiert und anschließend mittels Samstempel auf eine neue Selektionsplatte übertragen. Dieser Vorgang wurde insgesamt zwei Mal durchgeführt und nennt sich Replikaplattierung. Er dient der besseren Selektion positiver Klone.

Nach der Replikaplattierung wurden die Klone mit Hilfe der Hefe-Kolonie PCR (2.11.2.1) genauer untersucht. Dabei wurden Primer Gal4AD und Gal4AD-RV verwendet, welche die cDNA des Prey-Plasmides amplifizieren (Anhang 8.2). Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, wobei hier schon durch Vergleichen der cDNA-Längen eine erste Aussage über die Spezifität des Screens vorgenommen werden kann. Sind viele der Amplifikate auf einer Höhe handelt es sich vermutlich um dieselbe cDNA, wobei es sich bei einem heterogenen Bild oft unterschiedliche cDNAs handelt. Nach der Analyse des Gels wurden die Amplifikate ausgewählt, welche sequenziert werden sollten. Hierfür wurde die PCR zunächst mit Hilfe des NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kits (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) aufgereinigt und danach zur Sequenzierung verschickt. Für die Sequenzierung wurde der Primer Prey_attB_fwd verwendet (Anhang 8.2).

Kommt eine cDNA mehrmals vor, wurde über eine Retransformation des Prey-Plasmides in den Bait-Stamm die Interaktion zwischen Transkriptionsfaktor und Bait-Sequenz erneut untersucht. Hierfür wurde die Plasmid-DNA aus dem Hefe-Klon isoliert (2.11.11) und in *E. coli* durch Elektroporation transformiert (2.11.9). Die Selektion erfolgte über eine auf dem Prey-Plasmid enthaltene Antibiotikaresistenz. Dieser Schritt diente zur Vervielfältigung des Plasmides. Es folgte eine Plasmidisolation aus *E. coli* (2.11.10). Das Prey-Plasmid konnte nun erneut in den Bait-Stamm transformiert (2.11.20) und das Wachstum auf den Selektionsplatten analysiert werden. Als Positiv-Kontrolle diente der Bait-Stamm p53His2 und als Negativ-Kontrolle der pHis2.1. Beide enthielten das Prey-Plasmid pGADRec2-.

Ist Wachstum über der 3-AT-Grenze des Bait-Stammes vorhanden, kann von einer Interaktion zwischen Transkriptionsfaktor des Prey-Plasmides und der Sequenz des Bait-Stammes ausgegangen werden. In diesem Fall wurden weitere Untersuchungen hinsichtlich der Aktivierung bzw. Bindung durchgeführt.

2.11.22 Kultivierung einer Petersilien-Zellkultur

Die Kultivierung der Petersilien-Zellkultur erfolgte in 40 ml HA-Medium im Lichtschrank (CU-32L) bei 24 °C, 160 rpm und im Dunkeln. Alle sieben Tage wurde aus der Zellkultur etwas Flüssigkeit mit Zellmaterial (ca. 3 ml) in einen neuen 250 ml Erlenmeyerkolben mit frischem HA-Medium gegossen. Falls eine Petersilien-Zellkultur zur Isolierung von Protoplasten benötigt wurde, wurde aus der 7 Tage alten Dauerkultur zusätzlich mittels Metallsieb Zellmaterial in einen zweiten Kolben überführt. Diese Zellkultur wurde 5 Tage unter gleichen Bedingungen kultiviert.

2.11.23 Isolation und Transformation von Petersilie-Protoplasten

Die Isolation und Transformation der Protoplasten ist bei Koschmann (Koschmann *et al.*, 2012) beschrieben worden. Für jegliche in diesem Versuch beschriebenen Zentrifugationen wurde eine Beckman GS-6KR-Zentrifuge mit Ausschwingrotor verwendet.

Die für die Isolation von Protoplasten benötigte 5 Tage alte Petersilie-Zellkultur wurde auf zwei 50 ml Falcon aufgeteilt und zu einem Pellet zentrifugiert (300 g, 5 min). Das Pellet wurde in je 15 ml Enzymlösung (2.2.8) suspendiert und mit steriler 0,24 M CaCl_2 -Lösung auf 45 ml aufgefüllt. Diese Suspension wurde in je eine große Petrischale (150 mm Durchmesser) gefüllt, mittels Parafilm verschlossen und im Dunkeln für 20 Stunden bei ca. 20 rpm inkubiert. Zum Schluss wurde nochmals für 20 Minuten bei 40-45 rpm inkubiert, damit sich die Protoplasten vollständig von den Zelltrümmern lösen können. Anschließend wurde die Zellsuspension auf zwei 50 ml Falcons aufgeteilt und bei 300 g für 2 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nachdem der Überstand vorsichtig abgegossen wurde, wurden die Pellets in je 30 ml 0,24 M CaCl_2 -Lösung aufgenommen und vorsichtig resuspendiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation unter gleichen Bedingungen. Das Pellet wurde anschließend sorgsam in 25 ml P5-Medium suspendiert und die beiden Falcons zusammen vermengt. Nachdem erneut zentrifugiert wurde, entstand auf der Oberfläche der Flüssigkeit ein Ring aus flottierenden Protoplasten. Dieser wurde achtsam mit einer Transferpipette in ein frisches 50 ml Falcon transferiert und mit P5-Lösung auf 50 ml aufgefüllt und langsam 2-3 Mal invertiert. Die Flottierung der Protoplasten wurde wiederholt und anschließend der Protoplastenring auf zwei 15 ml Falcons aufgeteilt. Nachdem abermals flottiert wurde, sind die Protoplasten in ein neues 15 ml Falcon vermischt worden. Es wurde im Anschluss sofort mit der Transformation begonnen.

Während der Isolation der Protoplasten wurde für die Transformation je 20 µl Plasmid-DNA und 200 µl PEG-Lösung ($c = 0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) in ein 15 ml Falcon vorgelegt. Sollte die Pep25- bzw. Hormon- Induzierbarkeit der Sequenzen getestet werden, so wurde das jeweilige

Reporterplasmid (pBT10GUS-d35SLUC-Konstrukt) verwendet. Bei Untersuchungen über die Aktivierung von Sequenzen durch Transkriptionsfaktoren wurde eine Kotransformation durchgeführt. Für diese wurden der Expressionsvektor (pORE-d35S-pA-Konstrukt) und das Reporterplasmid im Verhältnis von 3:1 vermengt. 4D-pBt10GUS-d35SLUC wurde als Positivkontrolle verwendet, wobei die D-Box vom Petersilienpromotor des PR2-Gens stammt (Kirsch *et al.*, 2000; van de Löcht *et al.*, 1990; Rushton *et al.*, 2002) und als Negativkontrolle der Leervektor pBT10GUS-d35SLUC diente. Durch die Zugabe von 200 µl Protoplasten in die PEG-DNA-Lösung wurde die Transformation gestartet. Wichtig ist, die Protoplasten vorsichtig aber auch gründlich mit der PEG-DNA-Lösung zu mischen. Bei mehreren Ansätzen wurde im 30 Sekunden-Takt transformiert, sodass die Reaktion nach 20 Minuten im 30 Sekunden-Takt durch die langsame Zugabe von 5 ml $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -MES-Lösung abgestoppt werden konnte. Somit wurde sichergestellt, dass alle Ansätze exakt 20 Minuten inkubiert worden sind. Nachdem für 7 Minuten bei 150 g zentrifugiert wurde, konnte das Pellet in 6 ml P5-Medium resuspendiert werden. Die Hälfte des Ansatzes wurde auf ein zweites 15 ml Falcon überführt. Bei Analysen der Pep25-Induzierbarkeit wurde zu einem der Falcons zusätzlich Pep25-Lösung hinzu gegeben (Endkonzentration 300 ng/ml). Andernfalls wurden beide Proben als technische Replikate behandelt.

Nach einer 24 stündigen Inkubation im Dunkeln, liegend und bei 24 °C, erfolgte die Ernte der Protoplasten. Hierfür wurde jeder Ansatz mit je 9 ml CaCl_2 -Lösung aufgefüllt, vermischt und anschließend zentrifugiert (1.400 g, 10 min). Der Überstand wurde bis auf einen Milliliter abdekantiert und das Pellet in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert. Die Protoplasten wurden vorsichtig in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben und innerhalb von 25 Sekunden bei Topspeed mittels Tischzentrifuge pelletiert. Daraufhin konnte die überstehende Flüssigkeit vollständig entfernt und das Pellet in flüssigem Stickstoff tiefgefroren werden. Die gefrorenen Pellets wurden bei -80 °C gelagert.

Die Bestimmung der GUS- und LUC-Aktivität erfolgte nach Aufschluss der Protoplasten. Die Proben wurden für 5 Minuten auf Eis aufgetaut. Alle nachfolgenden Arbeiten wurden auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt. Durch die Zugabe von 150 µl LUC-Extraktionspuffer, kurzem vortexen (ca. 10 s) und einer 20 minütigen Inkubation unter schütteln (Mixer 5432, Eppendorf) bei 4 °C wurden die Protoplasten aufgeschlossen. Durch zentrifugieren (25.000 g, 20 min, 4 °C) ist der Proteinextrakt von den Zelltrümmern getrennt worden. Der Proteinüberstand wurde nachfolgend zur Proteinbestimmung (2.11.24) verwendet. Die Proteinkonzentrationen wurden anschließend in LUC-Extraktionspuffer auf 80 µg/ml Gesamtprotein verdünnt. Es folgten die GUS- und LUC-Aktivitätsmessungen mittels Berthold TriStar LB 941 Plattenleser.

2.11.24 Proteinbestimmung nach Bradford

Für die Vermessung der Proteinkonzentrationen ist nach Bradford (Bradford, 1976) vorgegangen worden. Die Proben wurden 1:10 bis 1:50 in ddH₂O verdünnt (abhängig von der zu erwartenden Proteinkonzentration) und je drei Mal 50 µl in eine durchsichtige 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert. Zusätzlich wurde drei Mal eine Blindprobe (Probenpuffer in entsprechender Verdünnung) vorgelegt. Zu jeder Probe wurde 200 µl Bradfordlösung zugegeben und die 96-Well Mikrotiterplatte für 5 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Vermessung der Absorption erfolgte am Berthold TriStar LB 941 Plattenleser bei 590 nm (0,1 sec pro Well, Lampenenergie 13.000). Die Korrektur der Werte durch den Blindwert erfolgte automatisch.

Um die Proteinkonzentration bestimmen zu können mussten Standardreihen für jeden Probenpuffer erstellt werden. Hierfür wurden unterschiedliche BSA-Konzentrationen (10-100µg/ml; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingesetzt und in den jeweiligen Probenpuffer (Konzentration wie bei eingesetzten Proben) gelöst. Mit Hilfe der gemessenen Absorptionswerte ist eine Standardreihe bzw. eine Regressionsgleichung erstellt worden. Bei jeden neuen 5x RotiQuant Bradford-Reagenz (Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland) oder bei jeder neu eingesetzten Halogenlampe am Plattenleser, musste eine neue Standardreihe vermessen werden.

2.11.25 Luciferase-Assays

Zur Durchführung des Luciferase-Assays wurden Proteinextrakte von Petersilienprotoplasten verwendet, welche zuvor wie unter 2.11.23 extrahiert worden sind. Die Bestimmung der LUC-Aktivität erfolgte durch die Messung der Lumineszenz der Probe am Berthold TriStar LB 941 Plattenleser. Der Messzeitraum jeder Probe betrug 15 Sekunden, wobei das Messintervall 0,1 sec betrug. Von jeder Probe wurden je 50 µl Proteinextrakt (4 µg Protein) als Doppelbestimmung in eine weiße 96-Well Mikrotiterplatte vorgelegt. Zudem wurde der LUC-Extraktionspuffer als Blindprobe mit gemessen. Mit Hilfe von Injektoren des Plattenlesers wurden in jedes Well 175 µl LUC-Reaktionspuffer und 50 µl Luciferin-Substratlösung pipettiert, wodurch die Reaktion gestartet wurde. Alle Messwerte einer Probe wurden addiert und anschließend selbstständig um den Wert der Blindprobe korrigiert. Bei der Verrechnung der entgültigen LUC-Werte (Verrechnung der Doppelbestimmung) wurde der Wert jeder Probe durch die Division mit 3.529.052.500 RLU normiert. Dieser Wert entstand in den ersten Messungen und ist der bis dahin am höchsten gemessene LUC-Wert. Solange immer derselbe Wert zur Normalisierung verwendet wird, sind alle bisher gemessenen Werte vergleichbar. Die LUC-Aktivität diente für jede Probe als Maß für die Transformationseffizienz.

2.11.26 Qualitative GUS-Färbungen

Bei der qualitativen GUS-Färbungen einzelner Pflanzenorgane (Blätter, Blüten etc.) und den quantitativen GUS-Assays (2.11.27) mit Proteinextrakten aus *Arabidopsis*- bzw. Petersilie-Protoplasten sowie aus *Arabidopsis*-Blättern wurde wie bei Jefferson *et al.* (1987) vorgegangen.

Die Färbung der Blätter in einem qualitativen GUS-Assay erfolgte zunächst durch das Übersichten des zu färbenden Pflanzenmaterials mit GUS-Färbepuffer. Anschließend folgte 2-3-mal für je 5 min eine Vakuuminfiltration. Nach der Inkubation über Nacht bei 37 °C wurde anschließend das Material in 96 % Ethanol inkubiert um das Chlorophyll zu entfernen. Zur Dokumentation und Lagerung wurden die Präparate in 70 % Ethanol überführt.

2.11.27 Quantitativer GUS-Assay

Durch Fluoreszenzmessungen, bei welchen die zu vermessenden Proben mit einer Wellenlänge von 360 nm und die Emission bei 460 nm gemessen wurden, erfolgte die quantitative Vermessung der β -Glucuronidase (GUS). Dieses Enzym wandelt 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid (4-MUG) in das fluoreszierende Produkt 4-Methylumbelliferon (4-MU) um. Der Verlauf der katalytischen Umwandlung kann anhand des Anstieges der gemessenen Fluoreszenz in FU/s vermessen werden. Diese ergibt sich aus einer linearen Regression der Messwerte einer Probe im Messzeitraum. Für die Umrechnung des Fluoreszenzanstiegs (Δ FU pro Zeiteinheit) in die gebildete Produktmenge (pmol 4-MU pro Zeiteinheit), wurde eine Standardreihe verwendet, welche mit ansteigenden 4-MU-Konzentrationen erstellt wurde. Die Aktivität bzw. Menge der β -Glucuronidase in einer Probe wurde durch die Produktionsgeschwindigkeit pmol 4-MU/min angegeben. Die Messung der Fluoreszenz wurde mittels Berthold TriStar LB 941 bei 37 °C und einer Lampenintensität von 6.000 durchgeführt.

Für die Vermessung der β -Glucuronidase aus transformierten Petersilie-Protoplasten (2.11.23) ist zunächst die Proteinkonzentration bestimmt (2.11.24) und anschließend eine Konzentration von 80 μ g/ml eingestellt worden. Pro Messung wurden 25 μ l der Probe eingesetzt, was 2 μ g Gesamtprotein entspricht. Jede Probe wurde als Dreifachbestimmung vermessen. Die Messung erfolgte innerhalb von 3 Stunden mit einem Messintervall von 15 min. Die GUS-Aktivität der einzelnen Proben wurde mittels der zuvor bestimmten LUC-Werte normiert (2.11.25). Dies geschah durch die Division der GUS-Werte durch die jeweiligen normierten LUC-Werte. Bei der Normierung von Pep25-behandelten Protoplasten wurden beide Werte, ob mit Pep25 oder ohne, nur durch den LUC-Wert der unbehandelten Probe dividiert. Dies geschah aufgrund der deutlich reduzierten LUC-Aktivität bei den behandelten

Proben. Beide Wertepaare stammen aus demselben Transformationsansatz, was diesen Vorgang ermöglicht.

Für das Erstellen eines Diagrammes mittels Excel (Microsoft Office) wurde zuerst aus den einzelnen normierten GUS-Werten einer Probe der Mittelwert gebildet und die dazugehörige Standardabweichung berechnet. Die Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung der behandelten und unbehandelten Proben wurden nebeneinander in einem Säulendiagramm aufgetragen. Um zu prüfen, ob die normierten GUS-Werte der behandelten und unbehandelten Proben zueinander signifikant unterschiedlich sind, wurde mit Excel ein ungepaarter t-Test mit gleicher Varianz durchgeführt. Der Unterschied ist bei einem Wert $p \leq 0,05$ (5 %) signifikant, was in dem Diagramm als Sternchen über den dazugehörigen Balken gekennzeichnet wurde. Die normierten GUS-Werte und daraus errechneten Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzen sind tabellarisch im Anhang aufgeführt.

2.11.28 Kultivierung von *A. thaliana* in Steril- bzw. Erdkultur

Für die Anzucht von sterilen *Arabidopsis*-Pflanzen sind zunächst ca. 1.000 Samen (ca. 20 mg) einer Sterilisation unterzogen worden. Bei dieser wurden die Samen in 70 % Ethanol für 2 min invertiert, das Ethanol anschließend durch 1 ml Sterilisationslösung ersetzt und weitere 8 min invertiert. Anschließend wurden die Samen vier Mal mit sterilem ddH₂O gewaschen. Zum Schluss wurden die Samen in 0.1 % Agaroselösung aufgenommen und mittels Pipette die gewünschte Anzahl auf eine ½ MS-Medium-Platte (mit entsprechendem Antibiotikum) gegeben. Nachdem die Platten etwas unter der Cleanbench getrocknet wurden, konnten diese mittels Leukopor (BSN medical, Hamburg, Deutschland) verschlossen werden. Die Stratifikation der Samen erfolgte für 48 h bei 4 °C im Dunkeln. In einem Lichtschrank (CU-32L und CU-36L/4, Percival Scientific, Perry, IA, USA) wurden die Samen bzw. Pflanzen bei ca. 24 °C und je nach Bedarf bei Langtagbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkelheit) bzw. Kurztagbedingungen (8 h Licht, 16 h Dunkelheit) inkubiert.

Bei der Anzucht von *Arabidopsis*-Pflanzen in Erdkultur wurde zunächst ein Gemisch aus Pflanzen- und Blumenerde (1:1 Gemisch, Compo Sana, Münster, Deutschland) erstellt. Ohne die Samen zuvor zu sterilisieren wurden diese auf zuvor stark gewässerter Erde ausgesät und zur Stratifikation bei 4 °C im Dunkeln für 48 h inkubiert. Auch hier erfolgte die Kultivierung in einer Klimakammer bei Langtag- bzw. Kurztagbedingungen. Die Wässerung der Erde erfolgte in regelmäßigen Abständen. Staunässe galt es zu vermeiden.

Die Vermehrung der Pflanzen erfolgte unter Langtagbedingungen, sodass sich ein Blütenspross bilden konnte. Mit Hilfe des ARACON-Systems (BETATECH, Gent, Belgien) konnten die Blütensprosse abgedeckt werden, sodass sich in diesen nach längerer

Inkubation Samenschoten bilden konnten. Nach der vollständigen Reifung der Schoten wurden die Pflanzen nicht mehr gewässert, bis die Schoten vollständig getrocknet waren. Bei der Ernte der getrockneten Samen wurde der komplette Samenstand in eine Papiertüte überführt und diese zwischen zwei Händen gerieben. Somit konnten sich die Samen aus den Schoten lösen und darauffolgend mittels eines Metallsiebes von übrigen Pflanzenresten getrennt werden. Die erhaltenen Samen wurden bei Raumtemperatur trocken bis zu ihrer Verwendung gelagert.

2.11.29 Transformation und Selektion von *A. thaliana*

Mit Hilfe der Floral Dip-Methode wurden in dieser Arbeit *A. thaliana*-Pflanzen mit T-DNA-Konstrukten transformiert. Dabei wurde mit einigen Modifikationen nach Clough und Bent (Clough und Bent, 1998) vorgegangen. Zunächst wurden die Pflanzen in Erdkultur gezogen, bis sie den ersten Blütenstand gebildet haben (2.11.28). Diese wurden abgeschnitten, wodurch eine vermehrte Blütenbildung stimuliert wird. Für die Transformation sind ungeöffnete Blüten am besten geeignet.

Zudem wurde eine 5 ml Vorkultur (LB-Medium mit Antibiotika) der zu transformierenden *A. tumefaciens*-Zellen erstellt und bei 25 °C für 24 h unter Schütteln inkubiert. 500 µl dieser Vorkultur wurden zur Erstellung einer Großkultur (400 ml) verwendet. Nach erneuter Inkubation bei 25 °C für 24 h unter schütteln wurden die Zellen mittels Zentrifugation (4.000 g, 30 min, RT) pelletiert. Das Pellet wurde in Inokulationsmedium zu einer OD600 von 0,8 resuspendiert.

Bei der Transformation sind die Blütenstände der Pflanze für 2-3 sec unter leichtem Schwenken in die Zellsuspension getaucht worden. In einer durchsichtigen Plastikabdeckung wurden die Pflanzen für 48 h in einer waagerechten Position bei den ursprünglichen Bedingungen weiter kultiviert. Dies diente zur Aufrechterhaltung der hohen Luftfeuchtigkeit. Nach Entfernung der Plastikabdeckung wurde weiter bis zur Samenbildung kultiviert. Nach der Ernte der Samen wurden diese sterilisiert (2.11.28) und entsprechend auf ½-MS mit Antibiotikum selektiert. Die resistenten Pflanzen wurden zur Vermehrung in Erde umgesetzt und stellen die T1-Generation dar. Sie besitzen alle unterschiedliche Integrationsstellen der T-DNA. Die T2 Generation, Nachkommen durch Selbstung der T1 Generation, wurde für die Untersuchungen der Promotor-Reportergenaktivität im Bezug auf verschiedene Stimuli eingesetzt (Hanko, 2013).

3 Ergebnisse

Die Sequenz 15 (27G-8_M1_S1) und Sequenz 2 (20u_M1_S1) sind im Petersilien-protoplastensystem Pep25-responsiv und gehören zu den am stärksten induzierten Sequenzen der 25 untersuchten *cis*-Elemente (siehe Kapitel 1.5) (Koschmann *et al.*, 2012). In dieser Arbeit wurden beide Sequenzen experimentell genauer charakterisiert. Dabei wurden die Elemente im nativen Promotorkontext analysiert, der Einsatz des Elementes im synthetischen Promotor untersucht und sequenzbindende Proteine identifiziert.

3.1 Die Sequenz 15 ist ein *cis*-regulatorisches Modul des *DJ1E*-Gens

Das *cis*-regulatorische Modul (CRM), die Sequenz 15, stammt aus dem Promotor des *DJ1E*-Gens (At2g38860). Die Abbildung 6 zeigt die Position des CRM-*DJ1E*, welche sich zwischen -161 und -126 upstream des Startcodons befindet. Die Sequenzlänge beträgt 35 bp.

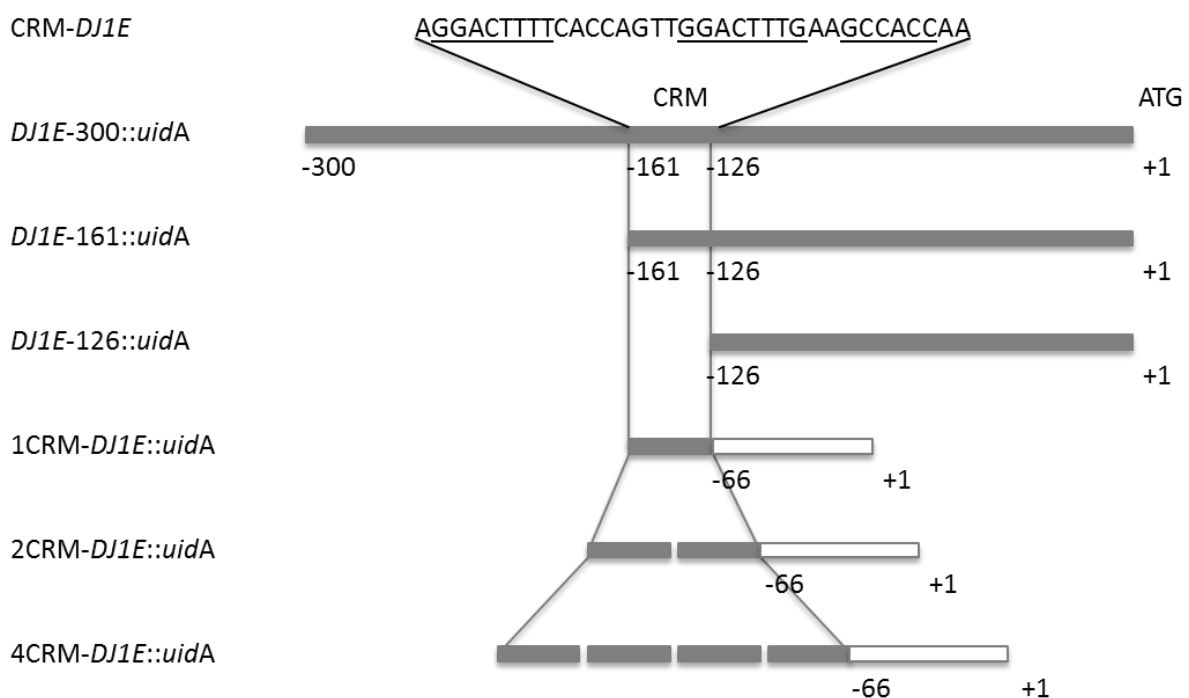


Abbildung 6: Die Sequenz des 35 bp langen *cis*-regulatorischen Moduls (CRM-*DJ1E*) und dessen Position upstream vom ATG (+1) des *DJ1E*-Gens

Drei putative *cis*-regulatorische Sequenzen des Moduls, zwei WT-Boxen (GGACTTTT, GGACTTTG) und eine GCC-Box-Variante sind unterstrichen. Gezeigt sind die in dieser Arbeit untersuchten Promotor-Reporter-Konstrukte. *DJ1E*-300::*uidA*, *DJ1E*-161::*uidA* und *DJ1E*-126::*uidA* enthalten eine 300 bp, 161 bp oder 126 bp lange upstream Promotorsequenz, welche vor dem Reportgen *uidA* (β -Glucuronidase) liegt. Zudem ist die Multimerisierung des Elementes dargestellt. 1CRM-*DJ1E*::*uidA*, 2CRM-*DJ1E*::*uidA* und 4CRM-*DJ1E*::*uidA* beinhalten jeweils ein Monomer, Dimer und Tetramer des CRMs. Diese Konstrukte beinhalten zusätzlich ein 66 bp langen Minimalpromotor des CaMV 35S Gens, welcher direkt upstream des Reportgens *uidA* (β -Glucuronidase) liegt.

3.1.1 Das CRM-*DJ1E* ist essentiell für die Pep25-responsive Genexpression

Um die Bedeutung des CRM-*DJ1E*s hinsichtlich der Pep25-Induktion im nativen Promotor zu untersuchen, wurden Reportergenkonstrukte mit drei unterschiedlich langen upstream-Promotorfragmenten erstellt. Diese kontrollieren die Genexpression des für das Reporterprotein β -Glucuronidase codierenden Reportergens *uidA*. Als Vektor diente pBT10GUS-d35SLUC, wobei der enthaltene Minimalpromotor (TATA-Box) vor dem *uidA*-Gen entfernt wurde (Koschmann *et al.*, 2012). Die Klonierung erfolgte wie in Kapitel 2.11.16 beschrieben. Die Bezeichnungen der Konstrukte lauten *DJ1E-300::uidA*, *DJ1E-161::uidA* und *DJ1E-126::uidA*. Das Promotor-Reportergenkonstrukt *DJ1E-300::uidA* enthält 300 bp upstream des nativen Promotors, wobei upstream des CRM-*DJ1E* noch weitere 139 bp enthalten sind. Im Gegensatz dazu fehlen diese zusätzlichen Basen im *DJ1E-161::uidA*-Konstrukt. *DJ1E-126::uidA* beinhaltet die 126 bp lange Sequenz upstream des Startcodons, wobei das CRM-*DJ1E* nicht enthalten ist. Es folgten die Untersuchungen hinsichtlich der Pep25-Responsivität im Petersilienprotoplastensystem (Kapitel 2.11.23).

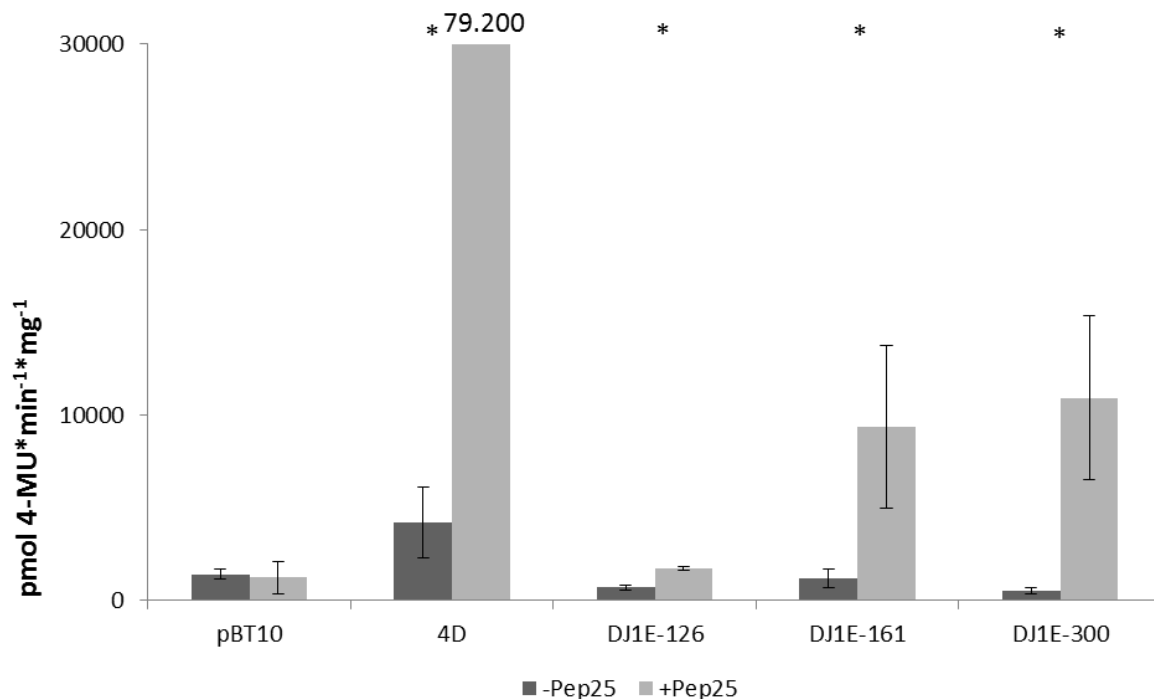


Abbildung 7: Pep25-Responsivität der upstream-Promotorfragmente des Gens *DJ1E*

Transiente Reportergen-Assays mit den Plasmiden, welche die 300, 161 und 126 bp Promotorfragmente des *DJ1E*-Gens im pBT10GUS-d35SLUC-Vektor (Koschmann *et al.*, 2012) ohne Minimalpromotor beinhalten. Verglichen werden Pep25-unbehandelte und -behandelte Proben. Die Unterschiede zwischen den mit * gekennzeichneten Werten sind signifikant ($p \leq 0,05$). Die entsprechenden Werte zur Abbildung sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Der Abbildung 7 ist zu entnehmen, dass die Promotorsequenz ohne das CRM-*DJ1E* (*DJ1E-126::uidA*) so gut wie keine Pep25-responsive Reportergenaktivität vermittelt. Die Expression ist auf einem vergleichsweise niedrigen Level wie der Leervektor pBt10. Bei dem

Promotorfragment, welches das CRM-*DJ1E* beinhaltet (*DJ1E*-161::*uidA*), kann eine erhöhte Pep25-responsive Reporter-genaktivität verzeichnet werden. Nach der Behandlung mit Pep25 ist die Reporter-genaktivität des 300 bp-Fragmentes (*DJ1E*-300::*uidA*) im Vergleich zum 161 bp-Fragmentes (*DJ1E*-161::*uidA*) nicht signifikant höher. Das CRM-*DJ1E* ist somit essentiell für die Pep25-responsive Genexpression des Gens *DJ1E* und es gibt keine weiteren Pep25-responsiven Elemente in dem untersuchten Promotorbereich.

3.1.2 Die Multimerisierung des CRM-*DJ1E* führt zu einem linearen Anstieg der Pep25-Responsivität

Im Vergleich zu früheren Untersuchungen, in welchen das CRM-*DJ1E* als Tetramer vor einem Minimalpromotor (TATA-Box) des CaMV 35S Gens kloniert wurde, vermittelt das CRM-*DJ1E* im 161 bp und 300 bp-Promotorfragment eine geringere Pep25-Responsivität. Das Tetramer (4CRM-*DJ1E*) erreicht normalisierte GUS-Werte von über 70.000 pmol 4-MU·min⁻¹·mg⁻¹ (Koschmann *et al.*, 2012), wohingegen die CRM-*DJ1E* enthaltenden Promotorfragmente Werte von bis zu 10.000 pmol 4-MU·min⁻¹·mg⁻¹ aufweisen (Abbildung 7). Um den Effekt der Multimerisierung auf die Pep25-Responsivität genauer zu untersuchen, wurde zusätzlich zum Tetramer (4CRM-*DJ1E*::*uidA*) ein Monomer (1CRM-*DJ1E*::*uidA*) und Dimer (2CRM-*DJ1E*::*uidA*) des CRM-*DJ1E* im Petersilienprotoplastensystem getestet.

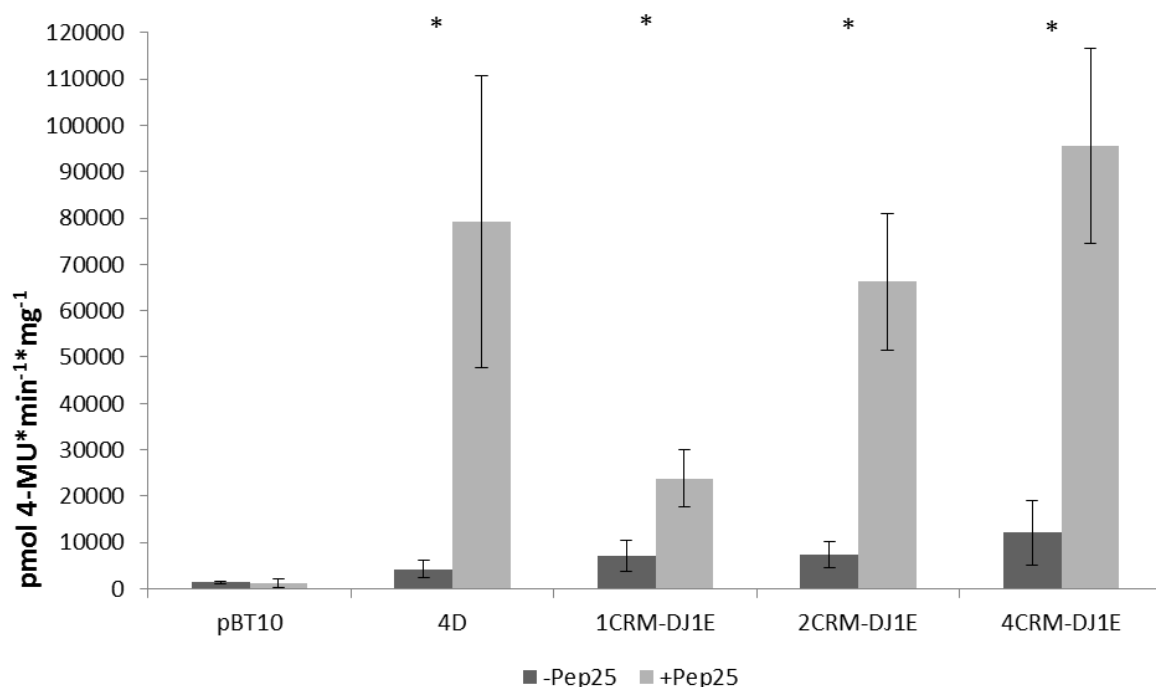


Abbildung 8: Pep25-Responsivität des Monomers, Dimers und Tetramers vom CRM-*DJ1E*

Transiente Reporter-gen-Assays mit den Plasmiden, welche das Monomer (1CRM-*DJ1E*), Dimer (2CRM-*DJ1E*) und Tetramer (4CRM-*DJ1E*) im pBT10GUS-d35SLUC-Vektor (Koschmann *et al.*, 2012) beinhalten. Verglichen werden Pep25-unbehandelte und -behandelte Proben. Die Unterschiede zwischen den mit * gekennzeichneten Werten sind signifikant ($p \leq 0,05$). Die entsprechenden Werte zur Abbildung sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Hierfür wurde, wie bei dem Tetramer, der Vektor pBT10GUS-d35SLUC verwendet (2.11.15). Auch hier diente Pep25 als Elicitor für das Experiment, welches wie in Kapitel 2.11.23 durchgeführt wurde. In Abbildung 8 ist zu erkennen, dass es vom Monomer über Dimer bis zum Tetramer zu einem linearen Anstieg der Pep25-vermittelten Reportergenaktivität kommt. Das Monomer (1CRM-*DJ1E::uidA*) des CRM-*DJ1E* vermittelt eine höhere Pep25-Responsivität (ca. 24.000 pmol 4-MU·min⁻¹·mg⁻¹) als der native Promotor mit dem ebenso enthaltenem *cis*-Element (*DJ1E*-161::*uidA*, *DJ1E*-300::*uidA*; ca.10.000 pmol 4-MU·min⁻¹·mg⁻¹). Dieses Ergebnis zeigt, dass synthetische Promotoren mit multimerisierten *cis*-Elementen und einem heterologen Minimalpromotor einen positiven Effekt auf die Pep25 Responsivität aufweisen können.

3.1.3 Das CRM-*DJ1E* enthält drei funktionelle *cis*-Sequenzen

Um den für die Pep25-Responsivität essentiellen Bereich genauer zu kartieren, wurden verschiedene Mutationen der Sequenz analysiert. Mittels bioinformatischer Analysen konnte keine bekannte Transkriptionsfaktorbindestelle (TFBS) für die 35 bp lange Sequenz des CRM-*DJ1E* ermittelt werden (Koschmann *et al.*, 2012). Weitere Recherchen ergaben, dass zwei in der Sequenz enthaltene Boxen eine Ähnlichkeit zu der neu identifizierten WT-Box CGACTTTT aufweisen (Bolivar *et al.*, 2014; Machens *et al.*, 2014). Diese Sequenzen sind in Abbildung 6 unterstrichen dargestellt. Zusätzlich zu den zwei WT-ähnlichen Boxen kommt noch eine weitere potentielle TFBS, die Sequenz GCCACC (Abbildung 6, unterstrichen), vor. Diese weist eine hohe Ähnlichkeit zur GCC-Box und zum *coupling element 1* (CE1) auf, welche beide mit AP2/ERF-Transkriptionsfaktoren interagieren (Lee *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2004). Die vier verschiedenen Mutationen wurden so konzipiert, dass sie die putativen Bindungsstellen und den Bereich dazwischen umfassen, um so deren Einfluss auf die Pep25-Responsivität im Petersilienprotoplastensystem zu überprüfen (Abbildung 9 A). Die Durchführung erfolgte wie in Kapitel 2.11.23 beschrieben. Verglichen werden Pep25-unbehandelte und -behandelte Proben. Die Untersuchung der Mutation 4 erfolgt in Zusammenarbeit mit Maren Wehrs (Wehrs, 2012). Der Abbildung 9 B ist zu entnehmen, dass die jeweiligen Mutationen der drei putativen TFBS alle einen enormen Einfluss auf die Pep25-Responsivität aufweisen (mut 1, 3 und 4). Es ist eine starke Reduktion der Pep25-vermittelten Reportergenaktivität zu erkennen. Im Gegensatz dazu zeigt die Mutation des Bereiches zwischen den Boxen keinen nennenswerten Unterschied zu der Wildtypsequenz. Diese Ergebnisse weisen auf die Notwendigkeit der Sequenzen GGACTTTT, GGACTTTG und GCCACC in Bezug auf die Pep25-Responsivität hin.

A

CRM-
DJ1E AGGACTTTTCACCAGTTGGACTTTGAAGCCACCAA

mut1 --AGTCCCC-----

mut2 -----TCTTCACCA-----

mut3 -----AGTCCCC-----

mut4 -----GGATTGTTGG-----

B

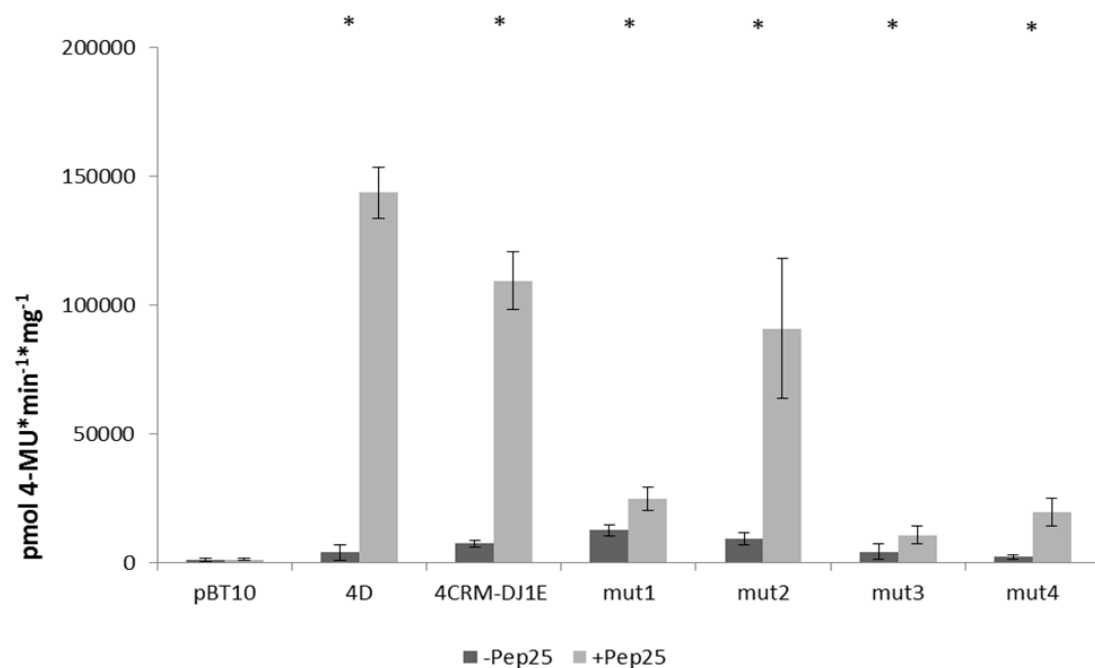


Abbildung 9: Pep25-Responsivität von Mutation 1, 2, 3 und 4 des CRM-*DJ1E*

A: Mutationen mut1 bis 4 im Vergleich zur Wildtypsequenz. B: Transiente Reporter-gen-Assays der Mutanten 1, 2, 3 und 4 des CRM-*DJ1E* im Vergleich zur Wildtypsequenz. Alle Konstrukte wurden als Tetramer im pBT10GUS-d35SLUC-Vektor getestet (Koschmann *et al.*, 2012). Die Unterschiede zwischen den mit * gekennzeichneten Werten sind signifikant ($p \leq 0,05$). Die entsprechenden Werte zur Abbildung sind in Tabelle 6 aufgeführt.

3.1.4 Hormon-Induktion des CRM-*DJ1E*

Pflanzenhormone spielen während einer Pathogen-Infektion eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung (1.3). Um herauszufinden, welchen Einfluss die Hormone auf die Reporter-gen-aktivität des CRM-*DJ1E* haben, wurden Hormon-induzierte Petersilienprotoplasten-Experimente durchgeführt. Dies geschah in Zusammenarbeit mit Konstantin Kanofsky (Kanofsky, 2014). Als Hormone wurden Salizylsäure (SA), Ethylen (ET) und Methyljasmonat (MeJA) verwendet. Getestet wurden das Tetramer des CRM-*DJ1E* und dessen Mutationen 1 bis 4. Durch die zusätzliche Analyse der Mutanten wird der Einfluss der jeweiligen Pep25-responsiven Boxen untersucht. Die Durchführung erfolgte wie in Kapitel

2.11.23 beschrieben. Verglichen wurden Hormon-behandelte sowie -unbehandelte Proben. Die Abbildung 10 zeigt die SA-induzierte Reporterogenaktivität des CRM-*DJ1E* und die dazugehörigen Mutationen 1 bis 4. Die Untersuchungen ergaben, dass die Reporterogenaktivität des CRM-*DJ1E* bei SA-Behandlung deutlich steigt. Im Gegensatz dazu kam es zu keiner Induktion bei der Behandlung mit ET, MeJA oder ET/MeJA (Abbildung 30, Anhang).

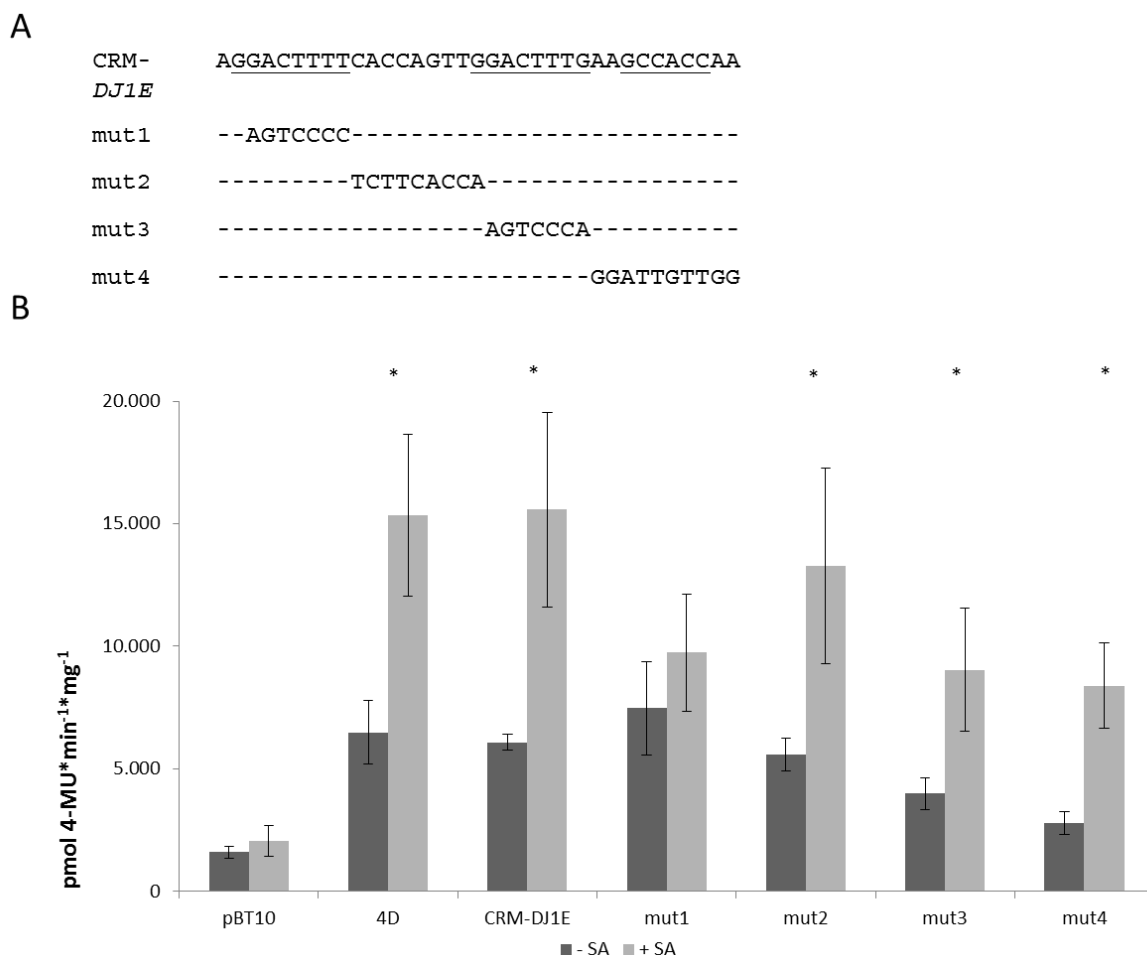


Abbildung 10: SA-vermittelte Reporterogenaktivität des CRM-*DJ1E* und mut1 bis 4

A: Mutationen mut1 bis 4 im Vergleich zur Wildtypsequenz. B: Transiente Reportergen-Assays der Mutanten 1, 2, 3 und 4 des CRM-*DJ1E* im Vergleich zur Wildtypsequenz. Alle Konstrukte wurden als Tetramer im pBT10GUS-d35SLUC-Vektor getestet (Koschmann *et al*, 2012). Verglichen werden SA-unbehandelte und -behandelte Proben. Die Unterschiede zwischen den mit * gekennzeichneten Werten sind signifikant ($p \leq 0,05$). Die entsprechenden Werte zur Abbildung sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Die Reporterogenaktivität des CRM-*DJ1E* ist bei der SA-behandelten Probe sichtlich höher als bei der unbehandelten. Die Mutationen 2, 3 und 4 weisen noch SA-vermittelte Reporterogenaktivität auf, wohingegen die Mutation 1 nicht mehr induziert wurde. Somit scheint die GGACTTTT-Box essentiell für die SA-vermittelte Reporterogenaktivität zu sein, wohingegen der Bereich der Mutationen 2 bis 4 adaptiv für die SA-Induktion sind.

3.1.5 Das CRM-*DJ1E* vermittelt Pathogen- und SA- induzierte Reporterogenaktivität in transgenen *A. thaliana*-Pflanzen

Um das CRM-*DJ1E* im homologen *Arabidopsis*-System zu analysieren, wurden in Zusammenarbeit mit Erik Hanko (Hanko, 2013) transgene *Arabidopsis thaliana* Pflanzen erstellt. Dafür wurde das Promotor-Reportergenkonstrukt 4CRM-*DJ1E::uidA* in einen T-DNA-Vektor kloniert, welcher im Folgenden für die Erstellung transgener Linien verwendet wurde. Die verschiedenen Linien besitzen alle einen singulären T-DNA-Locus an unterschiedlicher Stelle (Durchführung siehe Hanko, 2013). Um zu untersuchen, ob das CRM-*DJ1E* Pathogen-responsive Genexpression in *A. thaliana* verleiht, wurden fünf dieser Linien mit drei unterschiedlichen Pathogenen infiziert und anschließend histochemisch analysiert. Zum einen wurde der virulente Stamm *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 und der avirulente Stamm *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 avrRPM1 verwendet. Diese beiden Stämme zählen zu den biotrophen bzw. hemi-biotrophen Pathogenen (Glazebrook, 2005). Bei dem dritten Pathogen handelte es sich um den nekrotrophen Pilz *Botrytis cinerea*. Nach der Inkubation der transgenen Pflanzen mit dem jeweiligen Pathogen (2 Tage *Pseudomonas*, 3 Tage *Botrytis*) wurden die infizierten Blätter in einem histochemischen β -Glucuronidase (GUS) Assay angefärbt. Alle fünf Linien wiesen ähnliche Ergebnisse auf. In Abbildung 11 ist exemplarisch das Ergebnis einer Linie gezeigt (weitere Bilder siehe Hanko, 2013). Im Vergleich zu der Wasserkontrolle gibt es eine hohe GUS-Reporterogenaktivität um die jeweiligen Infektionsstellen herum. Somit kommt es bei allen drei Pathogenen zu einer CRM-*DJ1E*-vermittelten Reporterogenaktivität. Zudem gibt es nur eine sehr geringe Reporteraktivität bei der Wasserkontrolle, sowie in den nicht infizierten Bereichen der Pathogeninfizierten Blätter. Dies lässt auf eine niedrige Hintergrundaktivität des CRM-*DJ1E* in *Arabidopsis*-Pflanzen schließen.

Um das CRM-*DJ1E* in Bezug auf die Signalmoleküle nochmals genauer zu untersuchen, wurden in Zusammenarbeit mit Konstantin Kanofsky (Kanofsky, 2014) alle fünf transgenen Linien des CRM-*DJ1E* mit verschiedenen Hormonen behandelt und anschließend mittels β -Glucuronidase histochemisch gefärbt. Dafür wurden die Pflanzen mit den Hormonen SA (2 mM), MeJA (2 mM) und ET/MeJA (1 mM/ 50 μ M) gewässert und 24 Stunden inkubiert (Durchführung siehe Kanofsky, 2014). Anschließend erfolgte die histochemische Färbung. In Abbildung 11 ist zu erkennen, dass nur die SA-behandelten Blätter eine signifikante GUS-Färbung aufweisen. Die MeJA- und ET/MeJA-behandelten Blätter weisen keine oder nur eine geringe Reporterogenaktivität auf. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Beobachtungen der anderen vier transgenen Linien. Somit vermittelt das CRM-*DJ1E* nicht nur im Petersilienprotoplastensystem (Kapitel 3.1.4), sondern auch in transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen eine SA-vermittelte Reporterogenaktivität.

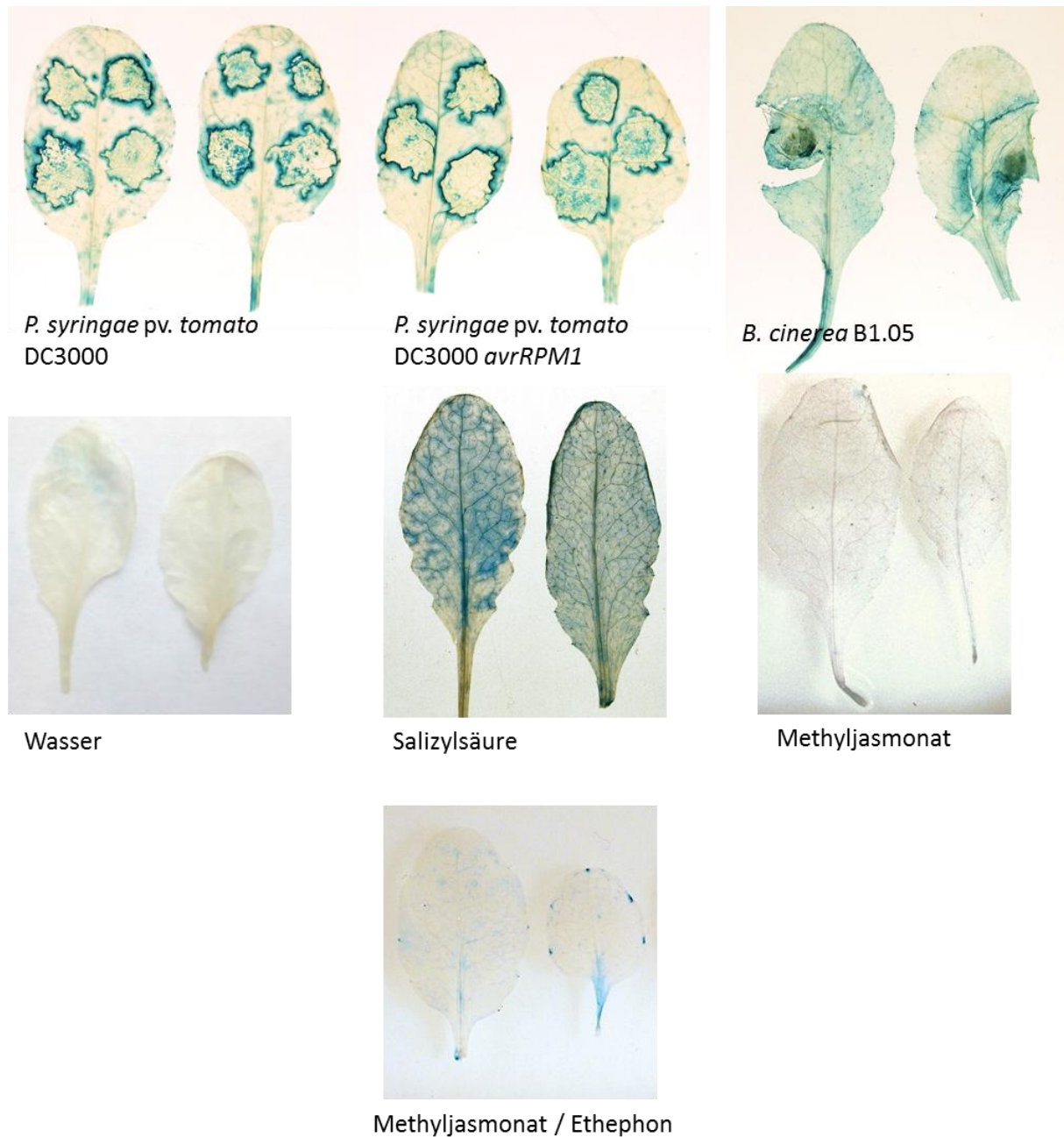


Abbildung 11: Pathogen- und Hormonbehandlung von transgenen CRM-DJ1E *A. thaliana*-Pflanzen

Gezeigt sind Blätter von transgenen 4CRM-DJ1E::uidA-Pflanzen. Die Blätter wurden mit Pathogenen (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000; *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1*; *Botrytis cinerea*) und mit Pflanzenhormonen (SA; MeJA; ET/MeJA) behandelt und nach entsprechender Inkubation histochemisch mittels β -Glucuronidase (GUS) Assay angefärbt. Als Negativkontrolle diente die Behandlung mit Wasser (Hanko, 2013).

3.1.6 ORA59 und ERF10 sind Regulatoren des CRM-DJ1E

Um die Transkriptionsfaktoren, welche mit dem CRM-DJ1E interagieren und somit für die MAMP-Induktion verantwortlich sind, zu identifizieren, wurde ein Yeast one Hybrid (Y1H)-Screen durchgeführt (Kapitel 2.11.21). Verwendet wurde hierbei die *Arabidopsis* Prey-Library von Mitsuda *et al.* (2010), welche insgesamt ca. 1500 Transkriptionsfaktoren umfasst. Als Bait-Stamm wurde der Y1H-Gold verwendet, welcher ein Tetramer des CRM-DJ1E im pHIS2.1-Vektor trägt. Die Hintergrundaktivität des Stammes konnte bei 50 mM 3-AT inhibiert werden (siehe Anhang Abbildung 26). Es wurden insgesamt ca. 252.000 Klone gescreent, was einer 163 fachen Abdeckung der TF-only Library entspricht. Durch die Selektion auf 50 mM 3-AT konnten 143 Klone identifiziert und weiter analysiert werden. Eine Auswahl von insgesamt 31 cDNAs der Klone wurde sequenziert. Insgesamt 17 cDNAs stammen aus der AP2/ERF-Transkriptionsfaktorfamilie, wobei ERF10 (At1g03800) neun und ORA59 (At1g06160) fünf Mal auftraten. Zudem wurde MYB96 (At5g62470) drei Mal isoliert (Tabelle 2, Anhang). Nach Retransformation der Prey-Vektoren in den CRM-DJ1E Bait-Stamm konnten die Transkriptionsfaktoren ORA59 und ERF10 Wachstum auf den entsprechenden Selektionsplatten vermitteln, wohingegen MYB96 kein Wachstum zeigte (Abbildung 12). Somit handelt es sich bei ORA59 und ERF10 um CRM-DJ1E-interagierende Transkriptionsfaktoren, wohingegen die Interaktion von MYB96 nicht bestätigt werden konnte

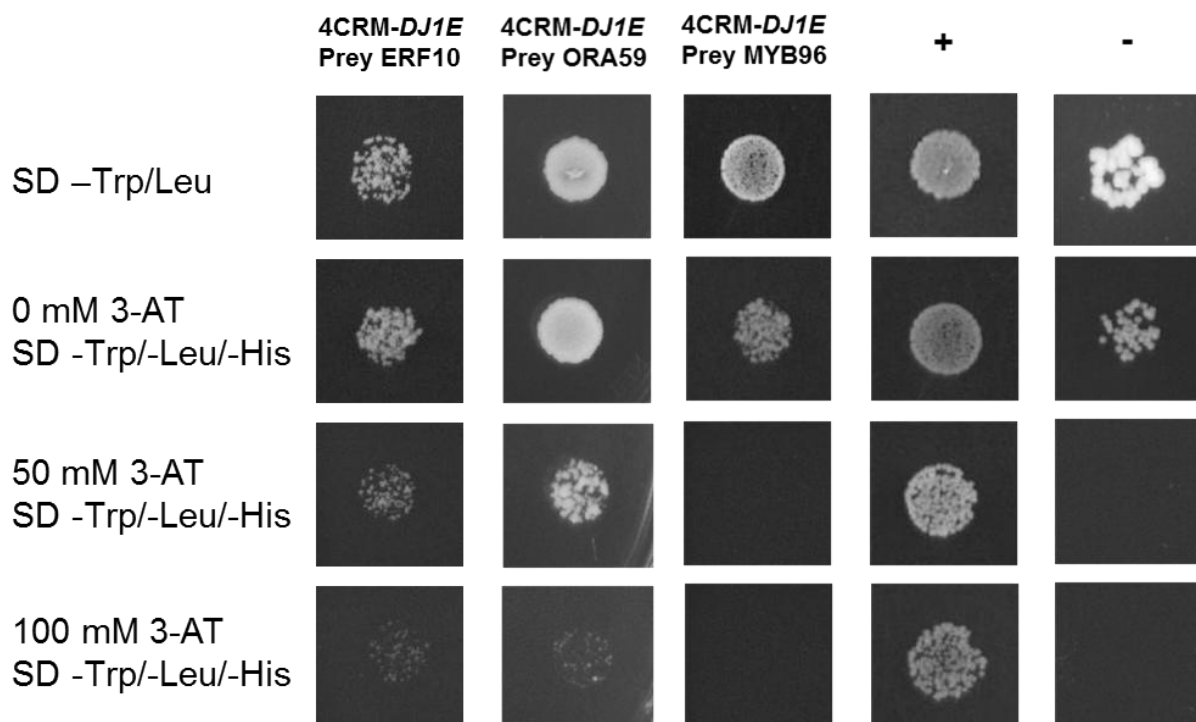


Abbildung 12: Reproduktion der Interaktion der Prey-Vektoren ERF10, ORA59 und MYB96 mit der Bait-Sequenz 4CRM-DJ1E

Gezeigt ist das Wachstum der entsprechenden Stämme auf Selektionsmedium mit steigendem 3-AT-Gehalt nach drei Tagen Inkubation. + Positivkontrolle (p53His2 + pGADRec2-53), - Negativkontrolle (pHis2.1 + pGADRec2-53SD).

Da AP2/ERF-Transkriptionsfaktoren bekanntlich mit GCC-Boxen interagieren, bestand die Hypothese, dass ERF10 und ORA59 mit der GCC-ähnlichen Box des CRM-*DJ1E* interagieren. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde ein Bait-Stamm erstellt, bei dem die GCC-ähnliche Box des CRM-*DJ1E* mutiert ist (Mutation 4, siehe Abbildung 13 A). Dieser wurde mit den jeweiligen Prey-Plasmiden transformiert und die Interaktion bei steigender 3-AT-Konzentration getestet. In der Abbildung 13 B ist das Wachstum dieser Stämme bei verschiedenen 3-AT-Konzentrationen gezeigt. Beide Stämme, mit dem Prey-Plasmid von ORA59 und ERF10, zeigen kein Wachstum ab 50 mM 3-AT. Dieses Ergebnis zeigt, dass die GCC-ähnliche Box essentiell für die Interaktion von ERF10 und ORA59 mit dem CRM-*DJ1E* ist.

A

CRM- AGGACTTTTCACCAGTTGGACTTTGAAGCCACCAA
DJ1E
 mut4 -----GGATTGTTGG

B

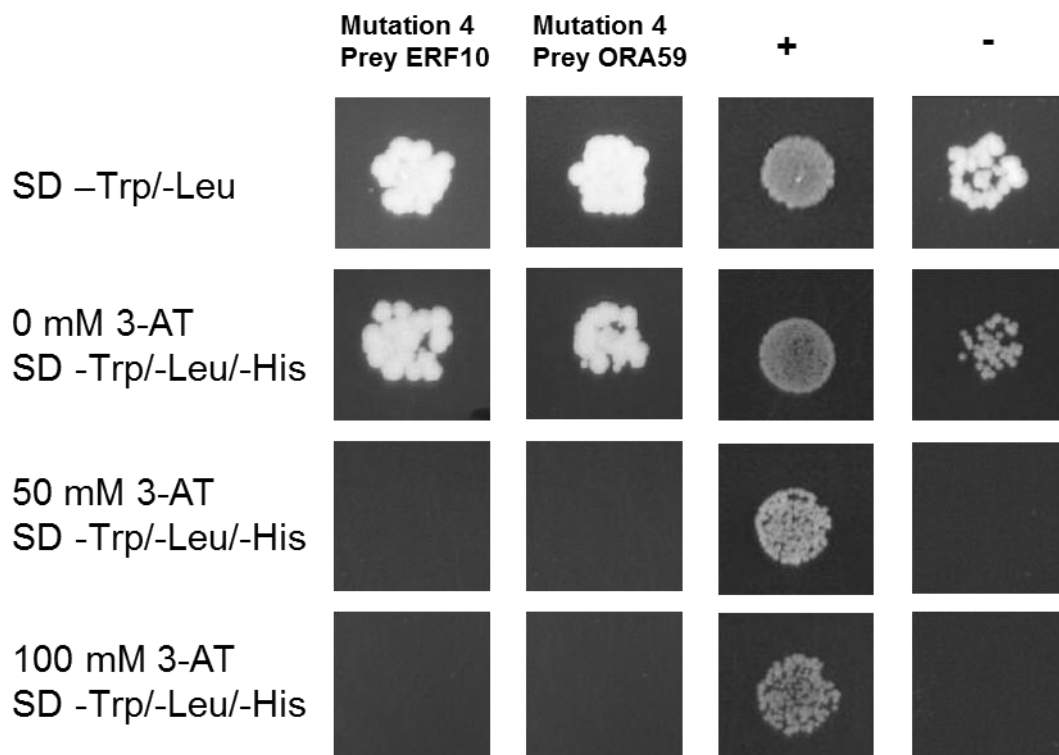


Abbildung 13: Interaktionstest vom Bait-Stamm der Mutation 4 des CRM-*DJ1E* mit der Prey-Vektoren ERF10 und ORA59

Gezeigt ist das Wachstum der entsprechenden Stämme auf Selektionsmedium mit steigendem 3-AT-Gehalt nach drei Tagen Inkubation. + Positivkontrolle (p53His2 + pGADRec2-53), - Negativkontrolle (pHis2.1 + pGADRec2-53SD).

Um die funktionelle Rolle der zwei AP2/ERF-Transkriptionsfaktoren in Bezug auf die CRM-*DJ1E* vermittelte Reporterogenaktivität zu testen, wurden Kotransformationsexperimente

durchgeführt. Hierfür wurde zunächst die jeweilige cDNA in einen Pflanzen-Expressionvektor (pORE) kloniert (Kapitel 2.11.19), um diesen anschließend zusammen mit dem 4CRM-*DJ1E::uidA*-Reportergenkonstrukt im Petersilienprotoplastensystem zu testen. Der Transkriptionsfaktor ORA59 ist ein transkriptioneller Aktivator, wohingegen ERF10 aufgrund des enthaltenen EAR-Motivs als transkriptioneller Repressor vorhergesagt wird (Ohta *et al.*, 2001; Pre *et al.*, 2008). Die Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse der Kotransformation von ORA59 mit dem CRM-*DJ1E* und dessen Mutation 4. Im Gegensatz zur Kotransformation des Leervektors, führt die Anwesenheit von ORA59 zu einer deutlichen Zunahme der CRM-*DJ1E*-vermittelten Reporteraktivität.

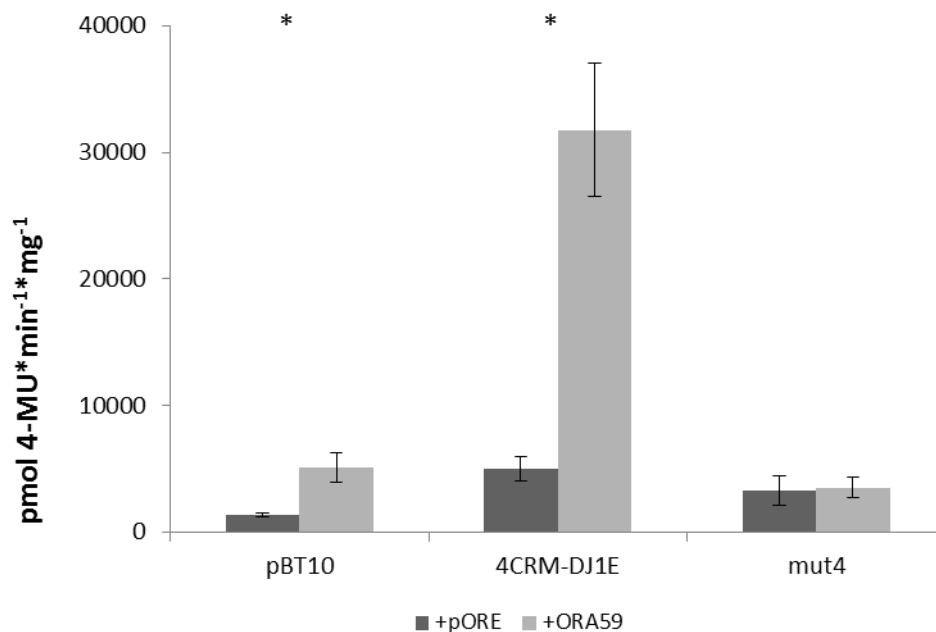


Abbildung 14: Kotransformation von ORA59 mit CRM-*DJ1E* und der Mutation 4

Transiente Reporteragen-Assays des CRM-*DJ1E* und der Mutation 4 kotransformiert mit ORA59. Alle Konstrukte wurden als Tetramer im pBT10GUS-d35SLUC-Vektor getestet. pBT10 ist der Leervektor und diente als Negativkontrolle der zu testenden Sequenz, pORE ist der Leervektor des Expressionsplasmids und diente als Negativkontrolle der Kotransformation. Die Mutation 4 enthält eine Mutation in der putativen ERF/AP2-Bindungsstelle GCCACC (siehe Abbildung 9 A). Verglichen werden ORA59-exprimierende Proben, mit der Kotransformation des Leervektors pORE. Die Unterschiede zwischen den mit * gekennzeichneten Werten sind signifikant ($p \leq 0,05$). Die entsprechenden Werte zur Abbildung sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Zusätzlich zum CRM-*DJ1E* wurde die Mutation 4 (mut4), welche in der putativen ERF/AP2-Bindungsstelle GCCACC liegt, zusammen mit ORA59 getestet (Abbildung 14). Es ist zu erkennen, dass durch die Mutation der GCCACC-Box, die Reporteragenaktivität der Kotransformation mit ORA59 auf der gleichen Höhe ist wie die ohne ORA59 (Leervektor pORE). Dieses Ergebnis zeigt die Notwendigkeit der putativen ERF/AP2-Bindungsstelle GCCACC für die Aktivierung der Reporteragenaktivität durch ORA59. Eine genauere Kartierung der für die Aktivierung von ORA59 notwendigen Nukleotide ist in Kapitel 3.1.7 aufgeführt.

Da es sich bei ERF10 vermutlich um einen Repressor handelt, ist für die Analyse der Repression des CRM-*DJ1E* zuerst eine Aktivierung der Sequenz notwendig (Ohta *et al.*, 2001). Deshalb wird bei diesem Versuchsansatz noch zusätzlich zwischen Pep25-behandelten und -unbehandelten Proben unterschieden. In Abbildung 15 sind die Ergebnisse der Pep25-behandelten Kotransformation von ERF10 mit dem CRM-*DJ1E* in Petersilienprotoplasten aufgeführt.

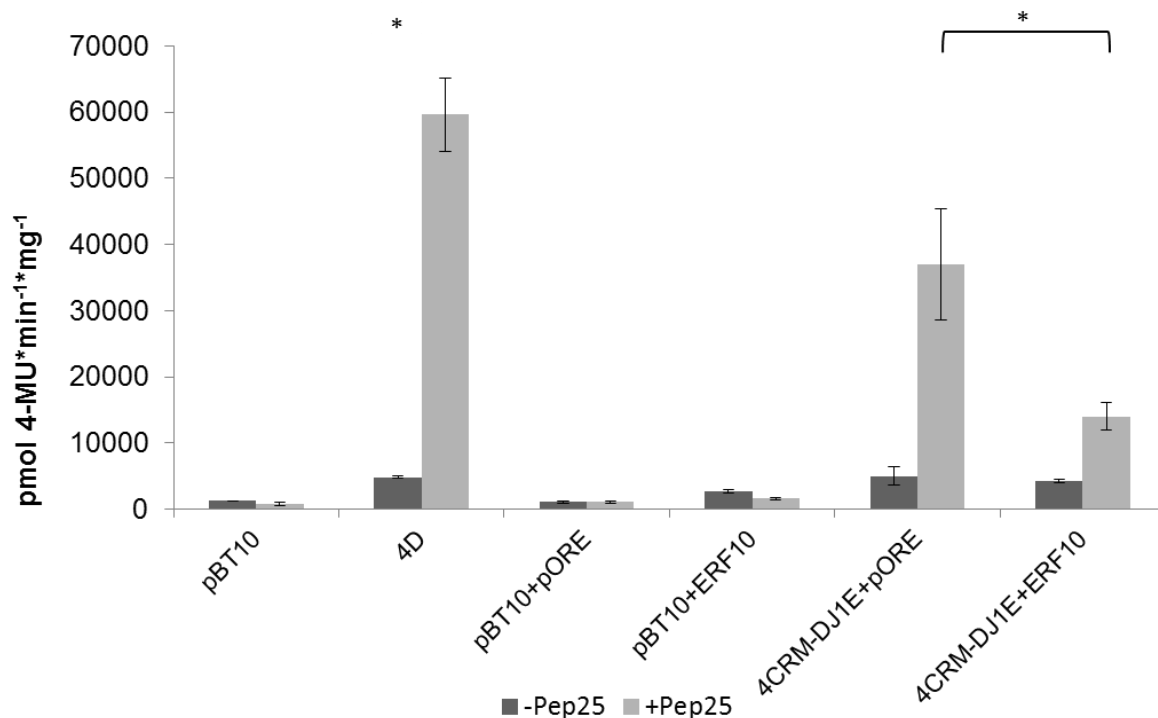


Abbildung 15: Kotransformation von ERF10 mit CRM-*DJ1E* und zusätzlicher Induktion mit Pep25

Transiente Reporter-Gen-Assays des CRM-*DJ1E* kotransformiert mit ERF10. Alle Konstrukte wurden als Tetramer im pBT10GUS-d35SLUC-Vektor getestet. pBT10 ist der Leervektor und diente als Negativkontrolle der zu testenden Sequenz, pORE ist der Leervektor des Expressionsplasmids und diente als Negativkontrolle der Kotransformation. Verglichen werden ERF10-exprimierende Proben, mit der Kotransformation des Leervektors pORE nach Pep25-Induktion. Die Unterschiede zwischen den mit * gekennzeichneten Werten sind signifikant ($p \leq 0,05$). Die entsprechenden Werte zur Abbildung sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Das Ergebnis zeigt deutlich, dass die Pep25-Responsivität der Kotransformation mit ERF10 um mehr als die Hälfte reduziert ist, als die mit dem leeren Expressionsvektor (pORE). Zudem gibt es keine Aktivierung der CRM-*DJ1E*-vermittelten Reporteraktivität durch ERF10 in Abwesenheit von Pep25. Dies weist auf eine Repression vom CRM-*DJ1E* durch ERF10 hin. Zusammengefasst kann die Aussage getroffen werden, dass ORA59 und ERF10 antagonistisch mit dem CRM-*DJ1E* interagieren, ORA59 als Aktivator und ERF10 als Repressor.

3.1.7 ORA59 benötigt die Kernsequenz GCCNCC zur Aktivierung der Genexpression

In Zusammenarbeit mit Sarah Ahrendt wurden die Nukleotide identifiziert, welche für die Aktivierung der Genexpression durch ORA59 notwendig sind (Ahrendt, 2014). Vorexperimente haben gezeigt, dass der Bereich um die GCCACC-Box im CRM-*DJ1E* für die Aktivierung notwendig ist (3.1.6, Abbildung 14). Aus diesem Grund wurden insgesamt 8 Mutationen erstellt, welche den Bereich der putativen ERF/AP2-Bindungsstelle GCCACC umfasst. Diese Mutationen sind in Abbildung 16 A aufgelistet.

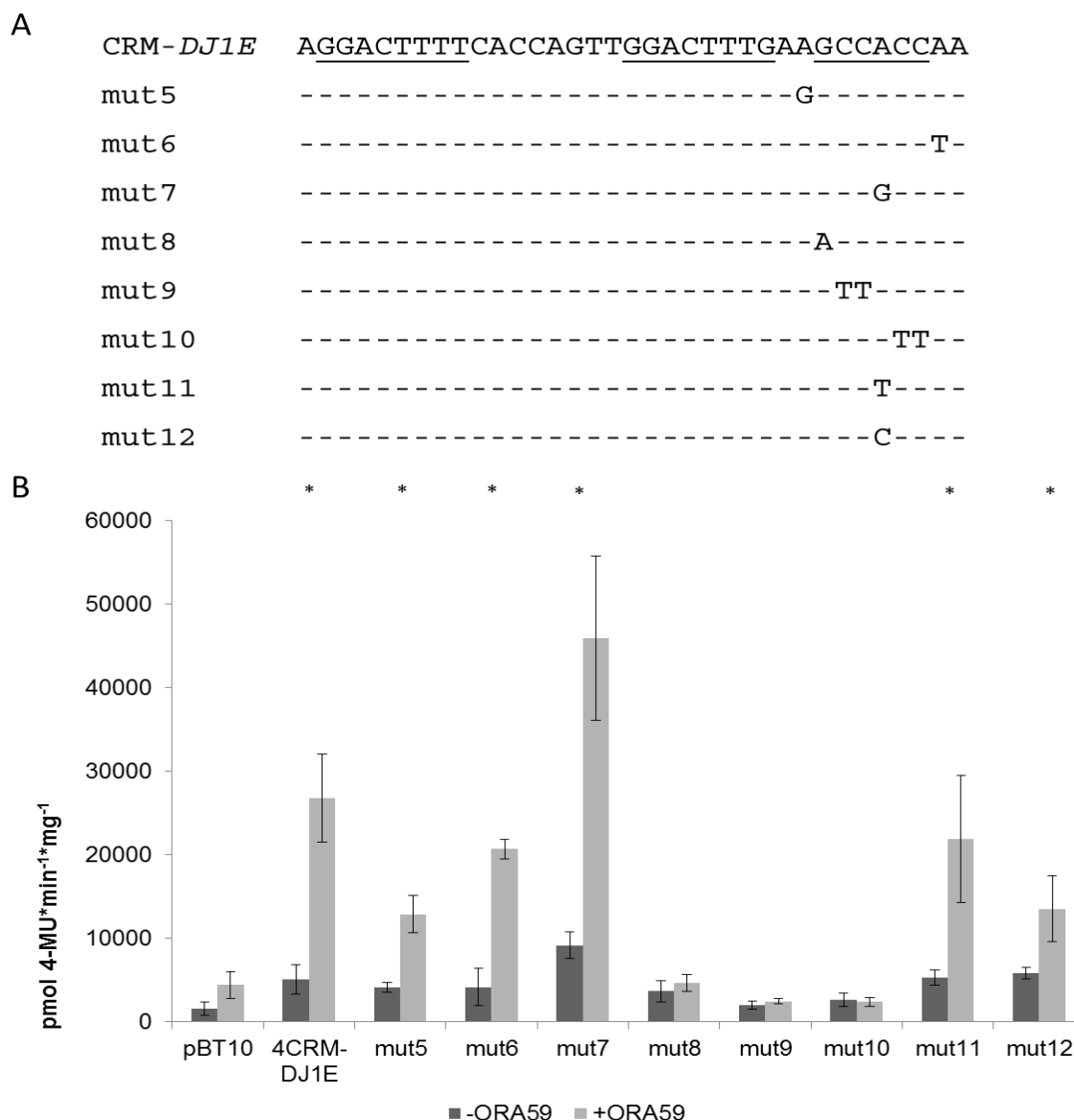


Abbildung 16: Kotransformation von ORA59 mit dem CRM-*DJ1E* und Mutation 5 bis 12

A: Mutationen 5 bis 12 im Vergleich zur Wildtypsequenz CRM-*DJ1E*. B: Transiente Reporter-gen-Assays des CRM-*DJ1E* und den Mutationen 5 bis 12 kotransformiert mit ORA59. Alle Konstrukte wurden als Tetramer im pBT10GUS-d35SLUC-Vektor getestet. pBT10 ist der Leervektor und diente als Negativkontrolle der zu testenden Sequenz, pORE ist der Leervektor des Expressionsplasmids und diente als Negativkontrolle der Kotransformation. Verglichen werden ORA59-exprimierende Proben, mit der Kotransformation des Leervektors pORE (Ahrendt, 2014). Die Unterschiede zwischen den mit * gekennzeichneten Werten sind signifikant ($p \leq 0,05$). Die entsprechenden Werte zur Abbildung sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Die Sequenzen wurden als Tetramer in den pBT10GUS-d35SLUC-Vektor kloniert (2.11.15) und anschließend in Kotransformationsexperimenten mit ORA59 verwendet. Die Kotransformation erfolgte im Petersilienprotoplastensystem wie im Kapitel 2.11.23 beschrieben. In Abbildung 16 B sind die Reporterogenaktivitäten der jeweiligen Mutationen in An- und Abwesenheit von ORA59 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Mutationen der GCCACC-Box umliegenden Nukleotide (mut5 und mut6) noch Reporterogenaktivität in Anwesenheit von ORA59 aufweisen. Im Vergleich zur Wildtypsequenz ist diese teilweise etwas schwächer. Die Mutation 7, in welcher das GCCACC zum GCCGCC mutiert wurde, weist eine höhere ORA59-vermittelte Reporterogenaktivität auf, als die Wildtypsequenz des CRM-*DJ1E*, jedoch besitzt diese Sequenz auch eine vergleichsweise höhere Hintergrundaktivität als die Wildtypsequenz. Bei der Mutation 8, 9 und 10 gibt es keine Aktivierung der Reportergenexpression durch ORA59, somit sind diese Nukleotide essentiell für die Transaktivierung. Interessanterweise ist die vierte Position der GCCACC-Box nicht essentiell für die ORA59-stimulierte Genexpression des CRM-*DJ1E*. Beim Austausch des Nukleotids zu einem T (mut11) oder C (mut12) kommt es noch immer zu einer ORA59-vermittelten Reporterogenaktivität, wobei diese auch etwas schwächer im Vergleich zur Wildtypsequenz oder zur Mutation 7 (GCCGCC) ist. Zusammenfassend ergibt sich eine GCCNCC-Kernsequenz für die Transaktivierung durch ORA59.

3.1.8 Keine direkte Interaktion von WRKY70 mit dem CRM-*DJ1E*

In Kapitel 3.1.3 konnte gezeigt werden, dass nicht nur die GCC-ähnliche Box des CRM-*DJ1E* wichtig für die Pep25-Induktion ist, sondern auch die beiden WT-ähnlichen Boxen. Im Y1H-Screen des CRM-*DJ1E* konnten außer ORA59 und ERF10 keine weiteren Transkriptionsfaktoren selektiert werden. Da die Anzahl an ERF/AP2-Transkriptionsfaktoren sehr dominierend war, lag die Vermutung nahe, dass WT-Box interagierende TFs aufgrund dieser Dominanz nicht selektiert werden konnten. Aus diesem Grund wurde ein Bait-Stamm erstellt, welcher eine um die GCC-Box verkürzte Version des CRM-*DJ1E* enthält (4CRM-*DJ1E_w/o_GCC*; Anhang 8.2). Dieser Stamm wurde in einem Y1H-Screen mit der TF-only Library eingesetzt (2.11.21). Der Screen wurde mit 50 mM 3-AT durchgeführt (Abbildung 27, Anhang) und es konnten insgesamt ca. 380.000 Klone gescreent werden. Dies entspricht einer 253 fachen Abdeckung der TF-only Library. Von 412 selektierten Klonen wurden bei 34 die cDNA sequenziert. Es konnte kein TF mehrfach selektiert werden (Tabelle 2, Anhang).

In kürzlich veröffentlichten Studien konnte gezeigt werden, dass es sich bei einer ähnlichen WT-Box um ein Bindemotiv von WRKY70 handelt (GACTTTT) (Machens *et al.*, 2014). WRKY70 konnte weder in dem Y1H-Screen mit der Wildtypsequenz des CRM-*DJ1E*, noch mit der verkürzten Sequenz (CRM-*DJ1E_w/o_GCC*) selektiert werden. Da die Motive

GGACTTTT und GGACTTTG jedoch sehr ähnlich zu der publizierten WT-Box sind (GACTTTT; Machens *et al.*, 2014), wurde in Zusammenarbeit mit Lilith Christaller (Christaller, 2014) eine Y1H-Interaktionsanalyse des CRM-*DJ1E* Bait-Stammes mit dem WRKY70-Preyplasmid durchgeführt. In Abbildung 17 ist zu erkennen, dass der Y1H-Gold Stamm mit dem CRM-*DJ1E* als Bait-Sequenz und WRKY70 als Prey kein Wachstum ab 50 mM 3-AT zeigt. Somit gibt es keine direkte Interaktion zwischen WRKY70 mit dem CRM-*DJ1E* in Hefe. Im Rahmen einer Masterarbeit konnte Konstantin Kanofsky die Bindung eines SA-induzierenden Zellkernproteins an der Sequenz des CRM-*DJ1E* nachweisen (Kanofsky, 2014). Dabei handelt es sich speziell um ein Protein, welches an die erste WT- Box im CRM-*DJ1E* bindet. Die Isolierung und Charakterisierung dieses WT-Box bindenden Proteins ist Teil der Doktorarbeit von Konstantin Kanofsky.

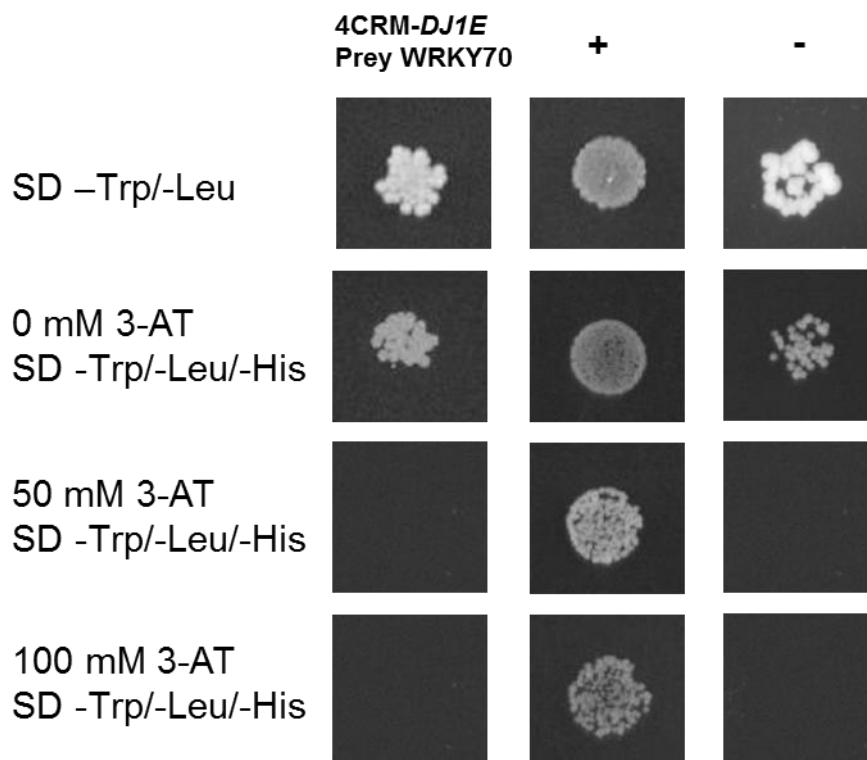


Abbildung 17: Interaktionstest vom Bait-Stamm des CRM-*DJ1E* mit dem Prey-Vektor WRKY70

Gezeigt ist das Wachstum der entsprechenden Stämme auf Selektionsmedium mit steigendem 3-AT-Gehalt nach drei Tagen Inkubation. + Positivkontrolle (p53His2 + pGADRec2-53), - Negativkontrolle (pHis2.1 + pGADRec2-53SD).

3.2 Die Sequenz 2 ist eine MAMP-responsive Sequenz des Gens At1g13990

Die 35 bp lange MAMP-responsive Sequenz (MRS) 2 stammt aus dem Promotor des Gens At1g13990 und liegt zwischen der Position -85 und -120 upstream des Startcodons. Das Protein des Gens und seine Funktion sind bisher nicht bekannt. In Abbildung 18 ist der Promotor und die Lage der MRS-At1g13990 dargestellt.

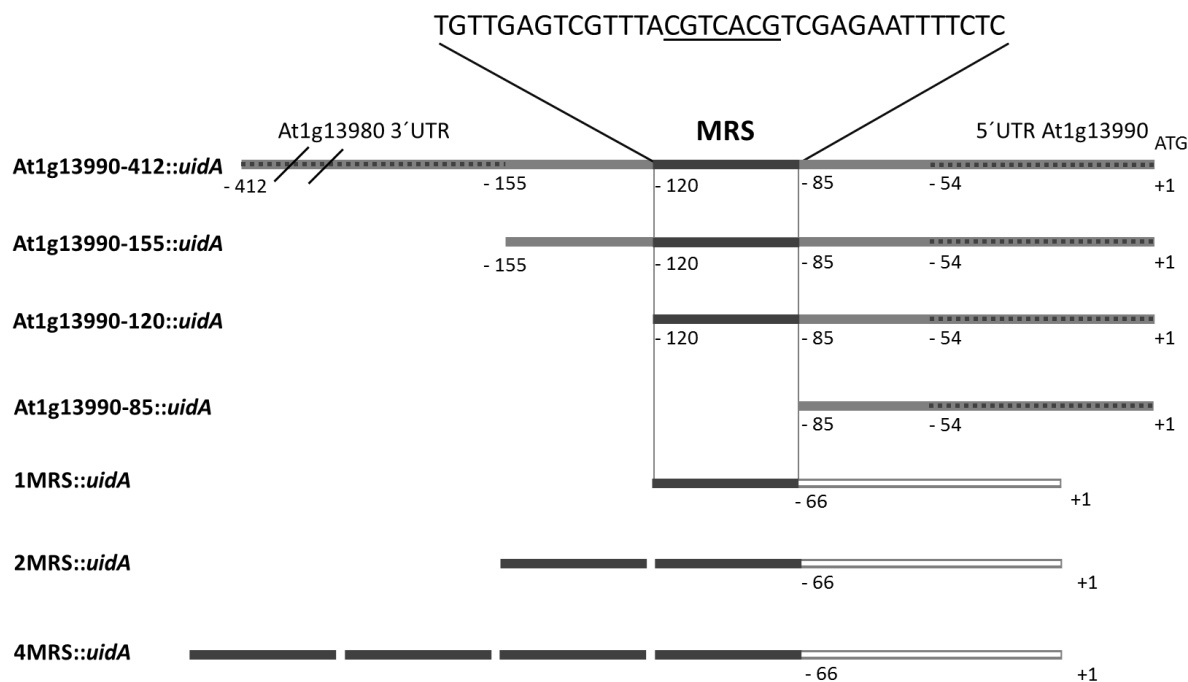


Abbildung 18: Die Sequenz der 35 bp MAMP-responsiven Sequenz (MRS) und deren Position upstream vom ATG (+1) des At1g13990-Gens

Gezeigt sind die in dieser Arbeit untersuchten Promotor-Reporter-Konstrukte. At1g13990-412::uidA, At1g13990-155::uidA, At1g13990-120::uidA und At1g13990-85::uidA enthalten eine 412 bp, 155 bp, 120 bp oder 85 bp lange upstream Promotorsequenz, welche vor dem Reportgen *uidA* (β -Glucuronidase) liegt. Zudem ist die Multimerisierung des Elementes dargestellt. 1MRS::uidA, 2MRS::uidA und 4MRS::uidA beinhalten jeweils ein Monomer, Dimer und Tetramer der MRS. Diese Konstrukte beinhalten zusätzlich ein 66 bp langen Minimalpromotor des CaMV 35S Gens, welcher direkt upstream des Reportgens *uidA* (β -Glucuronidase) liegt. Unterstrichen ist die bioinformatisch ermittelte Kernsequenz der MRS-At1g13990 (Koschmann *et al.*, 2012).

Die 5'UTR des At1g13990-Gens beginnt bei der Position -54 upstream des Startcodons. Die 3'UTR des At1g13980-Gens liegt bei der Position -155 bis -412. Die MRS befindet sich in der 101 bp langen intergenischen Sequenz und liegt -85 upstream des Startcodons des At1g13990-Gens.

3.2.1 Die MRS ist ausreichend für die Pep25-responsive Genexpression des Gens At1g13990

Um die MRS und deren Rolle in Bezug auf die Pep25-responsive Genexpression im nativen Promotor zu analysieren, wurden in Zusammenarbeit mit Lena Roling (2015) vier verschiedene Promotor-Reporter-gen-Konstrukte erstellt (Abbildung 18). Diese bestehen aus einem Promotorfragment, kloniert vor dem Repoter-gen *uidA* (β -Glucuronidase). Das längste, At1g13990-412::*uidA*, enthält 412 bp upstream des At1g13990-Startcodons bis zum Stopcodon des At1g13980-Gens. Dieses Konstrukt beinhaltet somit die 3'UTR (At1g13980) und die MRS. Das At1g13990-155::*uidA* ist 155 bp lang und die 3'UTR des At1g13980-Gens fehlt. Mit einer Länge von 120 bp enthält das At1g13990-120::*uidA* die MRS, der 35 bp-langen Bereich upstream der MRS und die 3'UTR des At1g13980 sind in diesem Konstrukt jedoch nicht enthalten. Bei dem kürzesten Fragment, das At1g13990-85::*uidA*, fehlt die MRS sowie alle davon upstream liegenden Sequenzen.

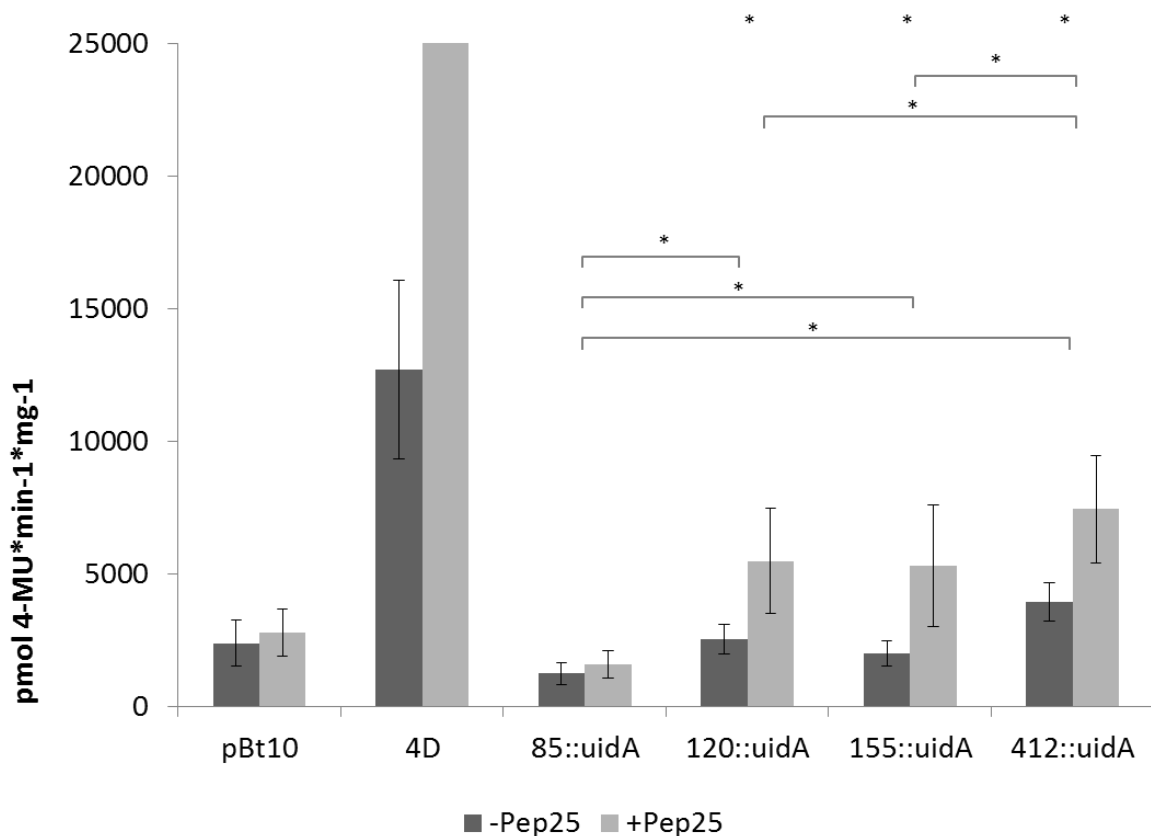


Abbildung 19: Pep25-Responsivität der upstream-Promotorfragmente des Gens At1g13990

Transiente Reporter-gen-Assays mit den Plasmiden, welche die 412, 155, 120 und 85 bp Promotorfragmente des At1g13990-Gens im pBT10GUS-d35SLUC-Vektor ohne Minimalpromotor beinhalten. Verglichen werden Pep25-unbehandelte und -behandelte Proben. Die Unterschiede zwischen den mit * gekennzeichneten Werten sind signifikant ($p \leq 0,05$). Die entsprechenden Werte zur Abbildung sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Als Vektor diente der pBT10GUS-d35SLUC ohne Minimalpromotor. Die Klonierung erfolgte wie in Kapitel 2.11.16 beschrieben. Anschließend wurden die Promotor-Reportergen-Konstrukte im Petersilienprotoplasten-system auf deren Pep25-Responsivität getestet (2.11.23). In Abbildung 19 sind die Werte der transienten Reportergen-Assays gegeneinander aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass die Reportergenaktivität des 85 bp langen Promotorfragments auf einem sehr niedrigen Expressionslevel liegt (vgl. pBT10) und es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Pep25-behandelten und -unbehandelten Proben gibt. Somit scheint die Sequenz vor der MRS für die Pep25-Induktion keine entscheidende Rolle zu spielen. Im Gegensatz dazu zeigt das At1g13990-120::uidA-Konstrukt eine deutliche Induktion der Reportergenaktivität durch Pep25. Zwischen dem 120 bp und 155 bp langen Fragmenten ist kein signifikanter Unterschied zu sehen. Das 412 bp lange Promotorfragment, welches die At1g13980-3'UTR beinhaltet, zeigt eine leicht höhere Pep25-induzierte Reportergenaktivität als die 120 bp und 155 bp Fragmente. Dies deutet auf einen quantitativen Effekt der 3'UTR des upstream liegenden Gens auf die Genexpression von At1g13990 hin.

3.2.2 Die Multimerisierung der MRS-At1g13990 erhöht die Reportergenaktivität

Im Gegensatz zu dem Tetramer der MRS-At1g13990, welches normalisierte GUS-Werte von bis zu 130.000 pmol 4-MU·min⁻¹·mg⁻¹ erreicht (Koschmann *et al.*, 2015), vermittelt das Monomer im nativen Promotor mit 5.000 pmol 4-MU·min⁻¹·mg⁻¹ eine viel geringere Pep25-responsive Reportergenaktivität (Abbildung 19, 120::uidA, 155::uidA). Um zu untersuchen, ob der vor dem Tetramer klonierte Minimalpromotor (TATA-Box) des CaMV 35S Gens oder die Multimerisierung ausschlaggebend für den starken Anstieg der Pep25-vermittelten Reportergenaktivität ist, wurde zusätzlich in Zusammenarbeit mit Lilian Gonzales (2015) zum Tetramer (4MRS::uidA), ein Monomer (1MRS::uidA) und ein Dimer (2MRS::uidA) der MRS im Petersilienprotoplastensystem getestet (Abbildung 18). Die Klonierung erfolgte, wie beim Tetramer, in den Vektor pBT10GUS-d35SLUC (2.11.15).

Die normalisierten GUS-Werte der Pep25-behandelten und -unbehandelten Proben des Mono-, Di- und Tetramers sind in Abbildung 20 aufgeführt. Im synthetischen Promotor ist ein linearer Anstieg der Pep25-Responsivität zu beobachten. Ebenso ist eine Zunahme der Pep25-unabhängigen Reportergenexpression zu erkennen. Die höchste Hintergrundaktivität ist bei dem Tetramer zu verzeichnen (Abbildung 20, ca. 55.000 pmol 4-MU·min⁻¹·mg⁻¹). Somit hat die Tetramerisierung der MRS nicht nur einen starken Effekt auf die MAMP-responsive Genexpression, sondern auch auf deren Basalaktivität. Im Vergleich zum Monomer der MRS im nativen Promotor (Abbildung 19, 5.000 pmol 4-MU·min⁻¹·mg⁻¹) ist die normalisierte GUS-Reportergenaktivität des 1MRS::uidA-Konstruktes im Kontext des CaMV-Minimalpromotors

um das Vierfache stärker (Abbildung 20, 20.000 pmol 4-MU·min⁻¹·mg⁻¹). Die Pep25-vermittelte Reportergenaktivität verdoppelt sich vom Monomer zum Dimer bzw. vom Dimer zum Tetramer.

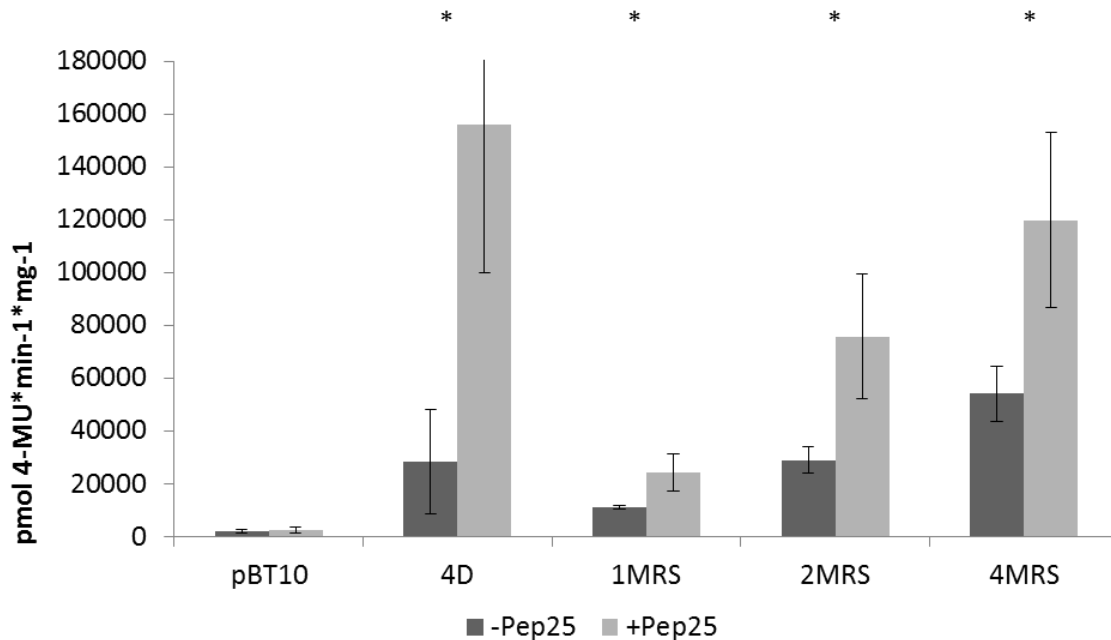


Abbildung 20: Pep25-Responsivität des Monomers, Dimers und Tetramers der MRS-At1g13990

Transiente Reportergen-Assays mit den Plasmiden, welche das Monomer (1MRS::*uidA*), Dimer (2MRS::*uidA*) und Tetramer (4MRS::*uidA*) im pBT10GUS-d35SLUC-Vektor beinhalten. Verglichen werden Pep25-unbehandelte und -behandelte Proben. Die Unterschiede zwischen den mit * gekennzeichneten Werten sind signifikant ($p \leq 0,05$). Die entsprechenden Werte zur Abbildung sind in Tabelle 12 aufgeführt.

3.2.3 Die MRS-At1g13990 enthält nur eine essentielle *cis*-Sequenz

Für die spezifischere Eingrenzung des Pep25-responsiven Sequenzbereichs wurden in mehreren Schritten Mutationen der MRS-At1g13990 untersucht. Diese Mutationen wurden als Tetramer in den pBT10GUS-d35SLUC-Vektor kloniert (2.11.15) und anschließend im Petersilienprotoplastensystem auf deren Pep25-Responsivität hin untersucht. Zuerst wurden drei Mutationen erstellt, welche die Sequenz in drei Teilen abdeckt (mut1 bis 3; Abbildung 21 A). Diese Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Maren Wehrs durchgeführt (Wehrs, 2013). In Abbildung 21 B sind die Pep25-Responsivitäten der Mutationen 1 bis 3 im Vergleich zur Wildtypsequenz dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Mutationen 1 und 2 zu einem vollständigen Verlust der Pep25-Responsivität führen. Auch die Pep25-unbehandelten Proben zeigen kaum noch Reportergenaktivität. Die Mutation 3 ist noch Pep25-responsiv und zeigt im Vergleich zur Wildtypsequenz nur einen leichten Abfall der Pep25-induzierten Reportergenaktivität.

A

MRS TGTTCGAGTCGTTTACGTCACGTCGAGAATTTTCTC

mut1 GAAGTCCCCTCT-----

mut2 -----TCACCAAGTCCCA-----

mut3 -----GGATTGTTGG

B

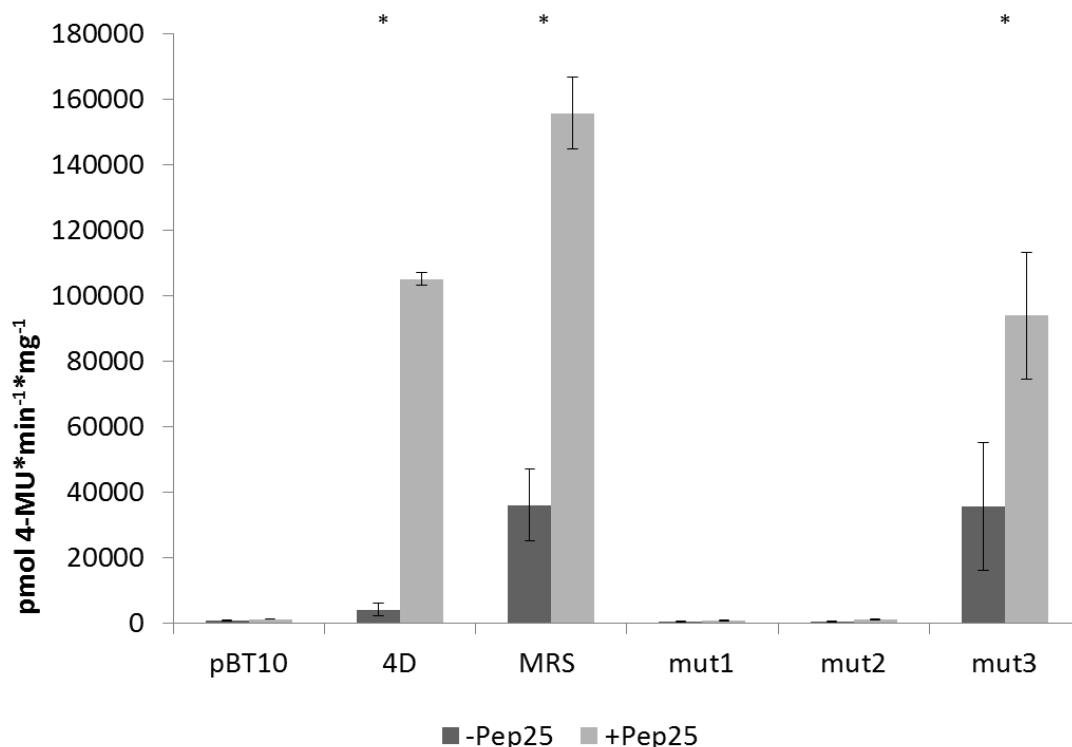


Abbildung 21: Pep25-Responsivität von Mutation 1, 2 und 3 der MRS-At1g13990

A: Mutationen mut1 bis 3 im Vergleich zur Wildtypsequenz. B: Transiente Reporter-gen-Assays der Mutanten 1, 2 und 3 der MRS-At1g13990 im Vergleich zur Wildtypsequenz. Alle Konstrukte wurden als Tetramer im pBT10GUS-d35SLUC-Vektor getestet. Verglichen werden Pep25-unbehandelte und -behandelte Proben. Die Unterschiede zwischen den mit * gekennzeichneten Werten sind signifikant ($p \leq 0,05$). Die entsprechenden Werte zur Abbildung sind in Tabelle 13 aufgeführt.

Da der Bereich der Mutation 1 und 2 für die Pep25-Induktion essentiell ist, wurde dieser Sequenzbereich in Zusammenarbeit mit Kai Zwara in 10 weiteren Mutationen unterteilt und getestet. In Abbildung 22 sind die entsprechenden Werte aufgetragen. Zusätzlich zu den in dieser Arbeit untersuchten Mutanten sind die Mutationen 14 und 15, untersucht mit Hilfe von Lena Roling, aufgeführt. Die Mutation 14 ist eine verkürzte Version der MRS und Mutation 15 eine Mutation der verkürzten Version (Roling, 2015).

Alle Mutationen, bis auf mut6 und mut13, zeigen eine geringere Pep25-vermittelte Reporter-genaktivität im Vergleich zur Wildtypsequenz. Die Nukleotide der Mutationen 8, 9 und 11 sind essentiell für die Pep25-responsive Reporter-genexpression, da diese keinen signifikanten Unterschied zwischen den Pep25-unbehandelten und -behandelten Proben

mehr aufweisen. Die verkürzte Version der MRS, die Mutation 14, weist eine verminderte Pep25-vermittelte Reporterogenaktivität auf (ca. 40.000 pmol 4-MU·min⁻¹·mg⁻¹). Im Vergleich dazu ist die Mutation 15 nicht mehr induziert.

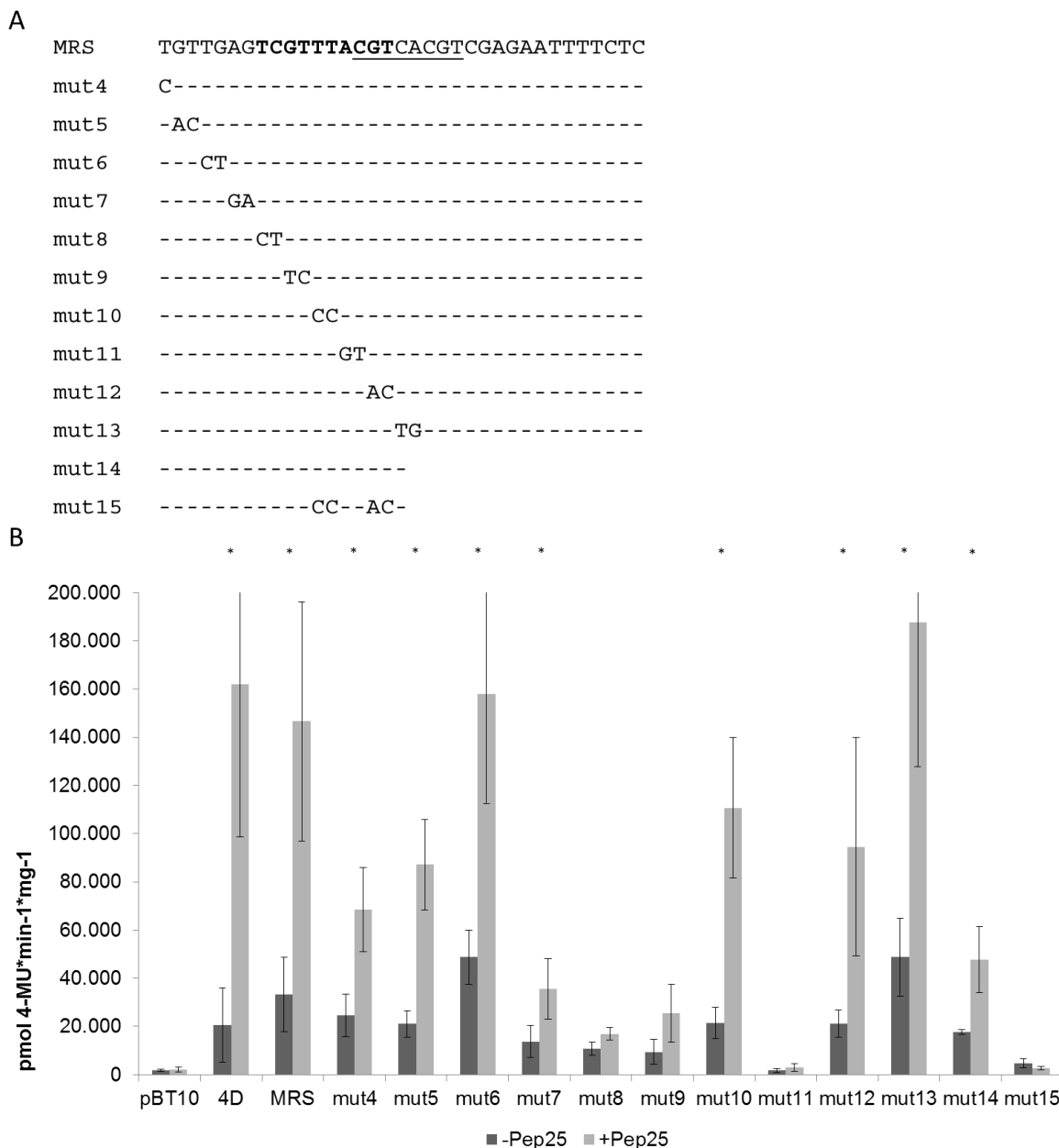


Abbildung 22: Pep25-Responsivität von Mutation 4 bis 15 der MRS-At1g13990

A: Mutationen mut4 bis 15 im Vergleich zur Wildtypsequenz. Die bioinformatisch ermittelte Kernsequenz der MRS ist unterstrichen (Koschmann *et al.*, 2012), die Pep25-essentielle Sequenz ist fett gedruckt. B: Transiente Reportergen-Assays der Mutanten 4 bis 15 der MRS-At1g13990 im Vergleich zur Wildtypsequenz. Alle Konstrukte wurden als Tetramer im pBT10GUS-d35SLUC-Vektor getestet. Verglichen werden Pep25-unbehandelte und -behandelte Proben. Die Unterschiede zwischen den mit * gekennzeichneten Werten sind signifikant ($p \leq 0,05$). Die entsprechenden Werte zur Abbildung sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Diese Ergebnisse grenzen den Pep25-responsiven Bereich der MRS noch weiter ein, wobei es nur zu einer leichten Überlappung der bioinformatisch ermittelten Kernsequenz der Motivgruppe kommt. Die verkürzte Version der MRS, die Mutation 14, enthält genau den

Pep25-responsiven Bereich und besteht aus 17 bp der 5'-Region der MRS. Die Mutation 14 vermittelt noch eine Pep25-responsive Genexpression, im Vergleich zur Wildtypsequenz ist diese jedoch viel geringer (Abbildung 22). Da die Mutationen 10 und 12 die Pep25-Responsivität geringfügig beeinflussten, wurde eine Doppelmutante beider Sequenzen erstellt, die Mutation 15. Diese Mutation vermittelt, im Gegensatz zu der Mutation 10 und 12, keine Pep25-vermittelte Genexpression mehr.

Alle Ergebnisse zusammengefasst ergeben eine 10 bp lange, für die Pep25-Responsivität essentielle Kernsequenz TCGTTTACGT. Für eine voll ausgeprägte Pep25-vermittelte Genexpression sind die umliegenden Nukleotide der MRS auch notwendig.

3.2.4 Die MRS-At1g13990 vermittelt Pathogen-responsive Reporter-genaktivität in *A. thaliana*

Für die Analyse der MRS-At1g13990 im homologen *Arabidopsis*-System, wurden transgene *Arabidopsis thaliana* Pflanzen erstellt. Dies geschah in Zusammenarbeit mit Erik Hanco (Hanco, 2013). Das Promotor-Reportergenkonstrukt 4MRS::*uidA* wurde dafür in einen T-DNA-Vektor kloniert und anschließend für die Erstellung transgener Linien verwendet. Es wurde darauf geachtet, dass die verschiedenen Linien alle einen singulären T-DNA-Locus an unterschiedlicher Stelle besitzen (Durchführung siehe Hanco, 2013). Die Untersuchungen der transgenen *A. thaliana* Pflanzen bezüglich der Pathogen-responsiven Genexpression der MRS wurden an fünf bzw. 4 (*B. cinerea*) verschiedenen Linien durchgeführt.

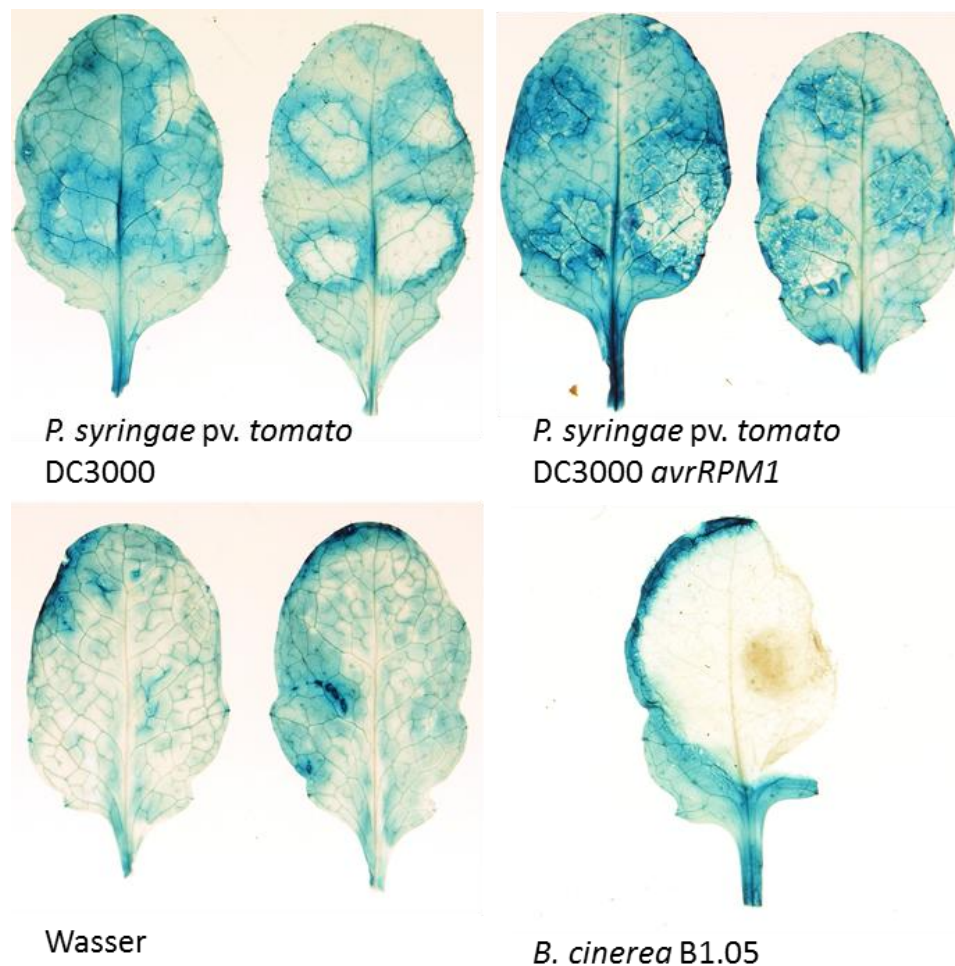


Abbildung 23: Pathogenbehandlung von transgenen MRS-At1g13990 *A. thaliana*-Pflanzen

Gezeigt sind Blätter von transgenen 4MRS-At1g13990::*uidA* Pflanzen. Die Blätter wurden mit Pathogenen (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000; *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRPM1*; *Botrytis cinerea*) behandelt und nach entsprechender Inkubation histochemisch mittels GUS-Assay angefärbt. Als Negativkontrolle diente die Behandlung mit Wasser (Hanco, 2013).

Infiziert wurden die Linien mit drei unterschiedlichen Pathogenen (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 avrRPM1, *Botrytis cinerea*) und nach entsprechender Inkubationszeit histochemisch mittels β -Glucuronidase (GUS) Assay analysiert. Genauere Angaben bezüglich der Versuchsdurchführung kann der Bachelorarbeit von Erik Hanco entnommen werden (Hanco, 2013). Die fünf/vier untersuchten Linien zeigten alle ein ähnliches Ergebnis. In Abbildung 23 ist eine Linie für alle Pathogene exemplarisch dargestellt (weitere Bilder siehe Hanco, 2013). Die Wasserkontrolle ist leicht blau verfärbt, dies weist auf eine leicht erhöhte Basalaktivität hin. Im Gegensatz zu der Wasserkontrolle zeigen die Pathogen-infizierten Blätter alle eine stark erhöhte GUS-Reporteraktivität um die Infektionsstelle. Dies deutet auf eine MRS-vermittelte Induktion des Reportergens in Bezug auf die drei verwendeten Pathogenen hin. Im Vergleich zu dem ebenfalls untersuchten CRM-DJ1E (Abbildung 11) gibt es einen erkennbaren Unterschied zwischen dem virulenten und avirulenten *P. syringae*-Stamm. Der avirulente Stamm zeigt, im Gegensatz zum virulenten, eine zusätzliche Blaufärbung in dem Bereich der Infektionsstelle. Zudem ist die Reporteraktivität im Gesamten stärker als bei dem virulenten *Pseudomonas*-Stamm. Das mit *Botrytis cinerea* infizierte Blatt zeigt in der Infektionsstelle keine Färbung, da der Bereich durch die Infektion abgestorben ist. Der noch intakte Pflanzenteil um die Infektionsstelle ist stark blau gefärbt.

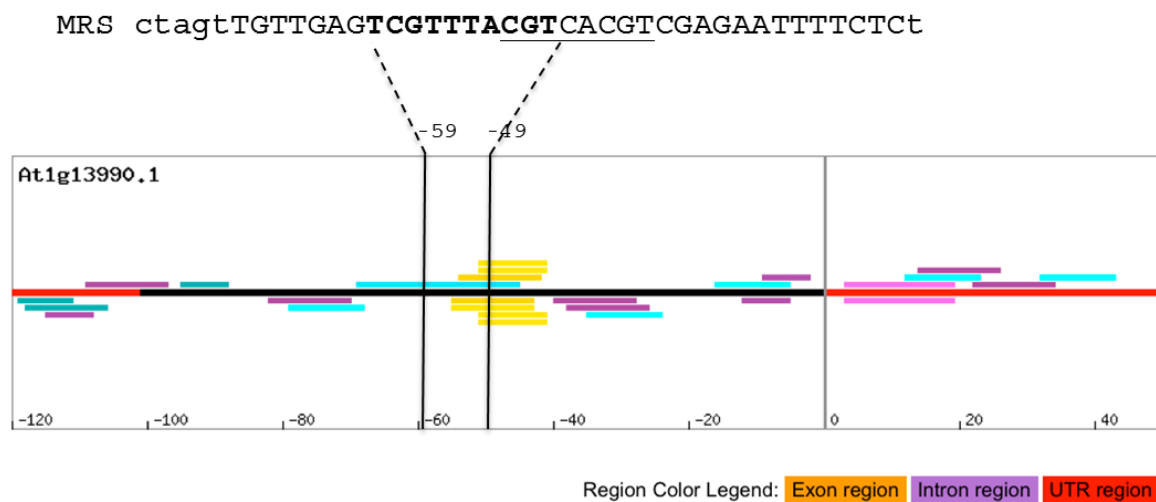
3.2.5 Transkriptionsfaktoranalyse

Für die Identifikation von Transkriptionsfaktoren, welche mit der MRS-At1g13990 direkt interagieren und somit zur MAMP-Responsivität der Sequenz führen, wurde das Y1H-System verwendet. Bei einem Y1H-Screen muss die hintergrundreduzierende 3-AT Konzentration des Bait-Stammes bestimmt werden (2.11.21.1). Das Hintergrundwachstum ist bedingt durch unspezifische Interaktionen der Sequenz mit Hefe-Transkriptionsfaktoren. Das Tetramer als auch das Dimer der MRS-At1g13990 als Bait-Sequenz zeigte keine Inhibition durch 100 mM 3-AT (siehe Anhang Abbildung 28 und Abbildung 29). Literaturrecherchen ergaben, dass sich in der Sequenz der MRS-At1g13990 ein Bindemotiv für den Sko1-Hefetranskriptionsfaktor befindet (T(G/T)ACGT(C/A)A). Sko1 gehört zu der Familie der ATF/CREB-DNA bindenden Familie und bindet mittels bZIP-Domäne an die jeweilige DNA (Proft *et al.*, 2005).

Da auf dem experimentellen Weg kein Transkriptionsfaktor isoliert werden konnte, wurde mittels bioinformatischer Analysen nach potentiell MRS-bindenden Proteinen ermittelt. Da die Sequenz TCGTTTACGT essentiell für den Pep25-induzierte Expression ist (Abbildung 22), wurde auch nur dieser Bereich für die Analyse verwendet. Eine frühere Untersuchung der bioinformatisch Identifizierten Kernsequenz der MRS (Abbildung 24 unterstrichen) ergab

Ähnlichkeiten mit bZIP-Transkriptionsfaktorbindestellen (Koschmann *et al.* 2012). Für die weitere bioinformatische Analyse von TF-Bindestellen wurde die AthaMap-Datenbank verwendet (Bülow *et al.*, 2009). AthaMap ist eine Datenbank für TF-Bindestellen im *A. thaliana*-Genom. Die Abbildung 24 zeigt eine grafische Darstellung der Analyse des Gens der MRS. Mit dieser Analyse konnte ebenfalls eine Interaktion mit bZIP-TFs gezeigt werden.

A



B

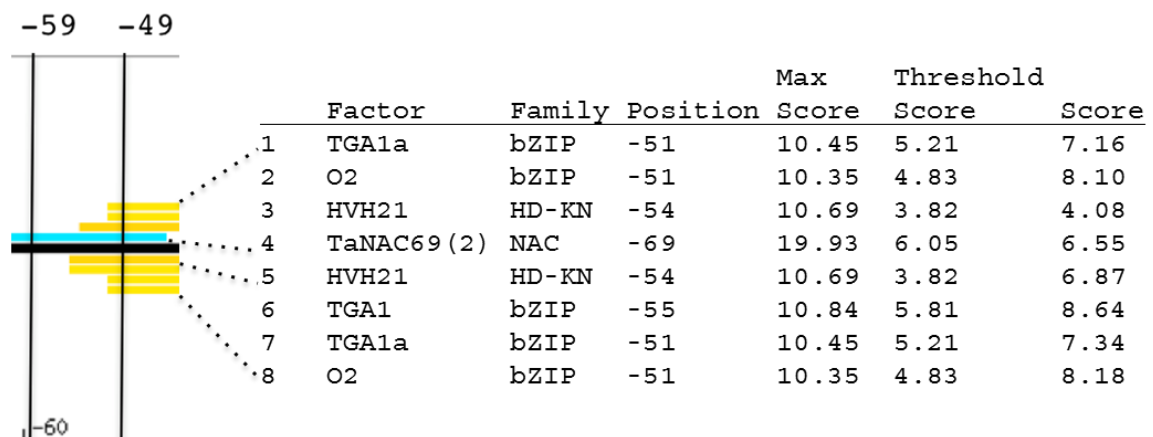


Abbildung 24: AthaMap-gestützte Identifikation putativer TF-Bindestellen der intergenischen und Pep25-essentiellen Region der MRS-At1g13990

A: Screenshot der Genanalyse von At1g13990 in AthaMap. Der untersuchte Bereich liegt auf der Position -120 und +50 relativ zum Transkriptionsstart des At1g13990-Gens. Analysiert wurde die Sequenz auf putative TF-Bindestellen. Zudem sind die Sequenz und die Position der MRS im nativen Promotor gezeigt. Die bioinformatisch ermittelte Kernsequenz der MRS ist unterstrichen (Koschmann *et al.*, 2012), die Pep25-essentielle Sequenz ist fett gedruckt. B: Eine detaillierte Ansicht der TF-Bindestellen des bioinformatisch analysierten Bereiches der MRS. Zudem ist die Position der ersten Nukleotide der Bindestelle und deren Score angegeben.

Die essentielle Pep25-responsive Region liegt jedoch im und neben dem 5'-Bereich der bioinformatisch ermittelten Kernsequenz (Abbildung 22, Abbildung 24 fett gedruckt). Es konnte mittels AthaMap die Interaktion mit nur einem Transkriptionsfaktor mit diesem Sequenzbereich vorausgesagt werden, welcher aus der Familie der NAC stammt. Experimente zur Selektion der Bindestelle des NAC-TF TaNAC69 aus Weizen ergaben eine Kernsequenz, welche die konservierten Trinukleotide CGT und ACG im Abstand von 7 Nukleotiden beinhaltet (Xue, 2005). Insgesamt erkennt TaNAC69 zwei Konsensus-Bindestellen (Xue *et al.*, 2006), eine davon weist eine hohe Analogie zur essentiellen Sequenz der MRS-At1g13990 auf (Abbildung 24 B). Kürzlich veröffentlichte Microarraydaten mit weiteren NAC-TF-Bindestellen sagen eine Interaktion von NAC46, 55 und 58 mit der Sequenz TCGTTTACGT voraus (Franco-Zorrilla *et al.*, 2014).

3.2.6 Kombinationsanalyse des CRM-*DJ1E* und MRS-At1g13990

Die Kombination unterschiedlicher *cis*-Elemente in einem synthetischen Promotor könnte gute Induzierbarkeit mit niedriger Hintergrundaktivität vereinen (Rushton *et al.*, 2009). Um zu untersuchen, inwiefern die Kombination der Sequenzen 15 und 2, also dem CRM-*DJ1E* und der MRS-At1g13990, Einfluss auf deren Funktionsweise hat, wurden Kombinationsanalysen beider Elemente durchgeführt. Hierfür wurden beide Sequenzen jeweils zwei Mal in unterschiedlicher Reihenfolge miteinander kombiniert. Die Multimerisierung erfolgte im pBT10GUS-d35SLUC-Vektor, wie im Kapitel 2.11.15.1 beschrieben. Insgesamt sind vier verschiedene Kombinationselemente als heterologe Tetramere erstellt und im Petersilienprotoplastensystem auf deren Pep25-Responsivität getestet worden. Untersucht wurden die Kombinationen 2-15-2-15::*uidA*, 15-2-15-2::*uidA*, 15-15-2-2::*uidA* und 2-2-15-15::*uidA*. Die normierten GUS-Werte wurden mit denen der homologen Tetramere der Sequenz 15 und 2 verglichen. Dies ist in Abbildung 25 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sich die Pep25-vermittelte Reportergenaktivität der heterologen Tetramere nicht signifikant von den homologen Tetrameren unterscheidet (zwischen 130.000-170.000 pmol 4-MU·min⁻¹·mg⁻¹). Jedoch ist die Basalaktivität der Kombinationselemente wesentlich höher als die der homologen Tetramere der Sequenzen 15 und 2. Die basalen Reportergenaktivitäten der Kombinationselemente ist mit 50.000-75.000 pmol 4-MU·min⁻¹·mg⁻¹ ungefähr doppelt so hoch wie bei der MRS-At1g13990 (ca. 35.000 pmol 4-MU·min⁻¹·mg⁻¹) und um ein vielfaches höher als bei dem CRM-*DJ1E* (ca. 19.000 pmol 4-MU·min⁻¹·mg⁻¹). Diese erhöhte Hintergrundaktivität wirkt sich auf die absolute Induktion der verschiedenen Elemente aus. In Tabelle 1 sind die errechneten Induktionsfaktoren (IF) aufgeführt.

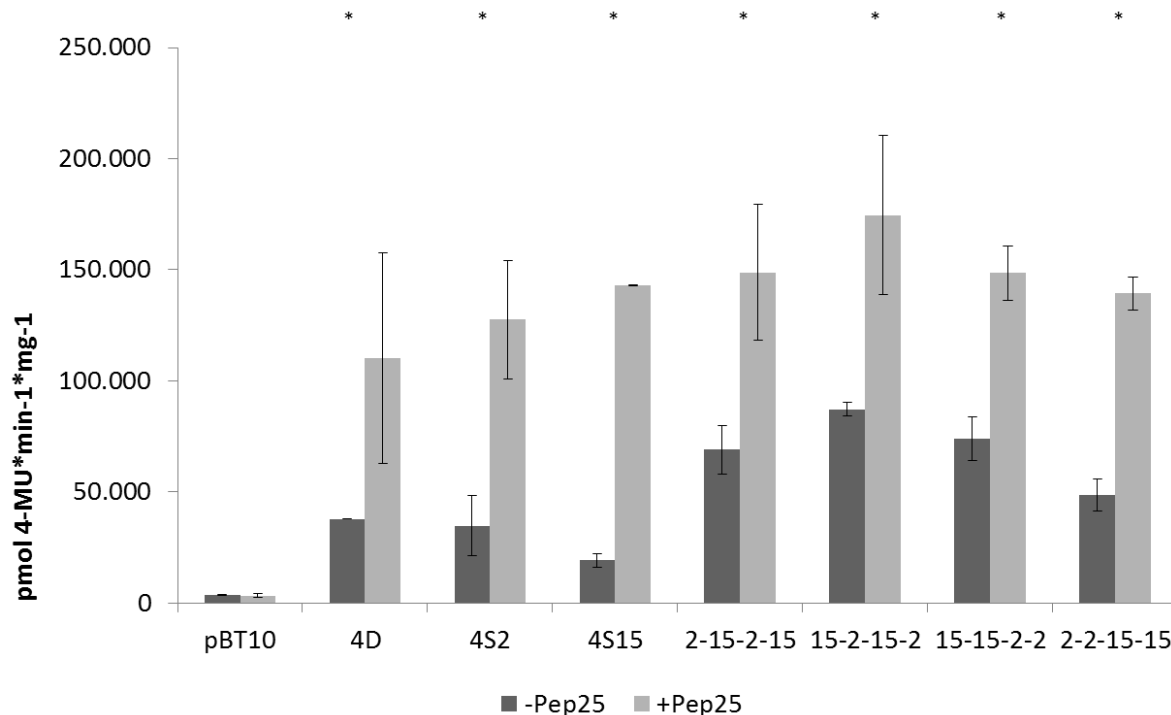


Abbildung 25: Pep25-Responsivität der Kombinationselemente der Sequenzen 2 und 15 im Vergleich zur Wildtypsequenz

Transiente Reporter-Gen-Assays der Kombinationselemente 2-15-2-15::*uidA*, 15-2-15-2::*uidA*, 15-15-2-2::*uidA* und 2-2-15-15::*uidA* im Vergleich zu den Tetrameren der Wildtypsequenz 4S2 (MRS-At1g13990) und 4S15 (CRM-DJ1E). Alle Konstrukte wurden als Tetramer mit dem Vektor pBT10GUS-d35SLUC getestet. Verglichen werden Pep25-unbehandelte und -behandelte Proben. Die Unterschiede zwischen den mit * gekennzeichneten Werten sind signifikant ($p \leq 0,05$). Die entsprechenden Werte zur Abbildung sind in Tabelle 15 aufgeführt.

Bei einem Induktionsfaktor von ca. 1 gibt es keine Pep25-vermittelte Reporter-Gen-Aktivität, wie es beim Leervektor (pBT10) der Fall ist (IF 0,97). Liegt der Wert über 1 handelt es sich um eine Pep25-vermittelte Induktion der Reporter-Gen-Aktivität, dies ist bei der Positivkontrolle (4D) ersichtlich (IF 2,92).

Tabelle 1: Induktionsfaktoren der Kombinationselemente im Vergleich zu den Wildtypsequenzen 2 und 15 (MRS-At1g13990; CRM-DJ1E)

Konstrukt	Induktionsfaktor (IF) +Pep25/-Pep25
pBt10:: <i>uidA</i>	0,97
4D:: <i>uidA</i>	2,92
4S2:: <i>uidA</i> (4MRS-At1g13990)	3,67
4S15:: <i>uidA</i> (4CRM-DJ1E)	7,45
2-15-2-15:: <i>uidA</i>	2,16
15-2-15-2:: <i>uidA</i>	2,00
15-15-2-2:: <i>uidA</i>	2,01
2-2-15-15:: <i>uidA</i>	2,87

Es gilt zu beachten, dass die jeweiligen Standardabweichungen nicht in den berechneten Induktionsfaktoren einbezogen sind und lediglich die absoluten Mittelwerte miteinander verglichen werden. Der Induktionsfaktor der Sequenz 2 (MRS-At1g13990) ist mit einem Wert von 3,67 höher als die der Positivkontrolle. Die Sequenz 15 (CRM-*DJ1E*) besitzt einen IF 7,45 und wird somit am stärksten induziert. Die Kombinationselemente weisen alle einen niedrigeren IF als die Positivkontrolle sowie beide homologen Tetramer (4S2/4S15) auf. Die Induktionsfaktoren von 2-15-2-15::*uidA*, 15-2-15-2::*uidA* und 15-15-2-2::*uidA* liegen ca. bei 2. Das 2-2-15-15::*uidA* liegt mit IF 2,87 etwas darüber. Die Daten zeigen exemplarisch, dass durch die Kombination der Elemente CRM-*DJ1E* und MRS-At1g13990 die Induktion verringert wird, bedingt durch den Anstieg der Basalaktivität. Da die Sequenz 2 (MRS-At1g13990) als homologes Tetramer eine sehr hohe Basalaktivität aufweist, würde die Kombination der Sequenz 15 (CRM-*DJ1E*) mit einem Pathogen-responsiven *cis*-Element mit niedriger Hintergrundaktivität vermutlich zu einer besseren Induzierbarkeit führen. Die Induzierbarkeit und Hintergrundaktivität von Kombinationskonstrukten scheint abhängig von der Auswahl der einzelnen *cis*-Elementen zu sein.

4 Diskussion

4.1 Die WT-Box, eine neue MAMP-responsive *cis*-regulatorische Sequenz

Mittels bioinformatischen Ressourcen und synthetischen Promotoren wurden neue MAMP-responsive *cis*-regulatorische Elemente identifiziert (Koschmann *et al.*, 2012). Eines dieser Elemente ist das *cis*-regulatorische Modul aus dem Promotor des *DJ1E*-Gens. Das CRM-*DJ1E* vermittelt Reporter-genaktivität gegenüber biotrophen und nekrotrophen Pathogenen, als auch Salizylsäure in transgenen *A. thaliana* Pflanzen (Abbildung 11). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass drei regulatorische Sequenzen verantwortlich für die MAMP- und SA-responsive Reporter-genexpression sind (Abbildung 9 und Abbildung 10). Es handelt sich hierbei um zwei WT-Boxen, GGACTTTT und GGACTTTG, und um eine GCC-ähnliche Box, GCCACC. In vorangehenden Arbeiten wurde die WT-box CGACTTTT als neue WRKY-Bindestelle beschrieben (Machens *et al.*, 2014). In einem Y1H-Screen mit dem CRM-*DJ1E* konnte WRKY70 trotz der enthaltenen WT-Boxen GGACTTTT und GGACTTTG nicht isoliert werden (Tabelle 2, Anhang). Auch konnte in einem Y1H-Interaktionstest mit dem CRM-*DJ1E* und WRKY70 keine Interaktion festgestellt werden (Abbildung 17). Daraus geht hervor, dass die WT-Box keine einheitliche Bindestelle ist, sondern mit mehreren verschiedenen TFs interagieren kann. Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass die in der WT-Box enthaltene Sequenz GACTTTT zuvor mittels bioinformatischer Analysen als eine putative, alleinstehende *cis*-regulatorische Sequenz bzw. als ein Teil eines größeren Promotorfragmentes von Stress-responsiven Genen identifiziert wurde (Zou *et al.*, 2011; Koschmann *et al.*, 2012). Basierend auf den Daten der vorliegenden Arbeit scheint die GACTTTT *cis*-Sequenz jedoch ein Teil von mindestens zwei unterschiedlichen Typen von *cis*-regulatorischen Sequenzen zu sein. Ein Teil interagiert mit WRKY-Transkriptionsfaktoren, wie WRKY70, und der andere mit bis jetzt noch unbekannten Transkriptionsfaktoren. Die zwei WT-Boxen des CRM-*DJ1E* scheinen durch unterschiedliche TFs induziert zu werden, da die Sequenz GGACTTTT, im Gegensatz zur GGACTTTG-Sequenz, essentiell für die SA-responsive Genexpression ist. Der SA-induzierte TF wird als WT-Box-bindendes Protein (WTBP) bezeichnet und gehört vielleicht zu einer noch unbekannten TF-Familie bzw. einer TF-Familie mit einer bis jetzt unbekannten Bindungsspezifität.

Ein interessanter Punkt ist die Ähnlichkeit der CTTT-Sequenz der WT-Box zur Bindungsstelle von DOF-TFs, welche AAAG lautet (Yanagisawa und Schmidt, 1999). Da die umliegenden Nukleotide der DOF-Kernsequenz die DOF-Bindungsspezifität ausmachen, wurden die zwei WT-Boxen des CRM-*DJ1E* mit den zuvor publizierten DOF-Bindungsstellen

verglichen. Es gibt keine weitere Ähnlichkeit der bekannten DOF-Bindungsstellen zu den in den CRM-*DJ1E* liegenden WT-Boxen (Yanagisawa und Schmidt, 1999). Zudem sind 32 der 35 in TAIR annotierten DOF-TFs in der in dieser Arbeit verwendeten TF-only Library enthalten, jedoch wurden diese nicht in dem Y1H-Screen des CRM-*DJ1E* isoliert (Mitsuda *et al.*, 2010; Swarbreck *et al.*, 2008). Da schon zuvor DOF-TFs mittels der verwendeten Library in Y1H-Screenings identifiziert werden konnten (Mitsuda *et al.*, 2004), scheinen die DOF-Faktoren nicht mit den im CRM-*DJ1E* liegenden WT-Boxen zu interagieren. Die TF-only Library enthält ca. 1500 *A. thaliana* TFs, verglichen dazu wird in der Pflanzen-Transkriptionsfaktor Datenbank PlnTFD eine Anzahl von 2657 TFs vorhergesagt. Diese Tatsache lässt vermuten, dass das WTBP nicht in der Prey Library enthalten ist und somit nicht mit dem CRM-*DJ1E* isoliert werden konnte (Mitsuda *et al.*, 2010; Perez-Rodriguez *et al.*, 2010).

Aufgrund der Tatsache, dass alle drei *cis*-Sequenzen des CRM-*DJ1E* notwendig für die MAMP- und SA- responsive Reporterogenaktivität sind (siehe Abbildung 9 und Abbildung 10), liegt die Vermutung nahe, dass die DNA-bindenden Proteine aller drei *cis*-Elemente mit einander interagieren. Möglicherweise bilden die TFs der beiden WT-Boxen einen Komplex, welcher auch Einfluss auf die Proteinbindung der GCC-ähnlichen Box hat. Durch die Mutation einer dieser drei Boxen könnte es zur Destabilisierung dieses Bindungskomplexes kommen.

4.2 Das CRM-*DJ1E* enthält eine ungewöhnliche AP2/ERF Bindestelle

Wie in Kapitel 3.1.6 gezeigt wurde, interagieren AP2/ERF-TFs mit der GCC-Box ähnlichen Sequenz. Die AP2/ERF TFs haben die klassische GCC-Box als Bindungsstelle, welche die Kernsequenz GCCGCC beinhaltet (Dietz *et al.*, 2010). Die davon abweichende Sequenz GCCACC wurde zuvor als ein Teil des kombinatorischen Elementes CE1 („coupling element“) beschrieben. Es wurde gezeigt, dass das CE und die ACGT-Box notwendig und ausreichend für die ABA-induzierte Genexpression in Getreide sind. Auch in zwei ABA-induzierten Gerste-Pflanzen enthielt das ABA-responsive Element die ACGT-Box als auch ein CE (Shen und Ho, 1995; Shen *et al.*, 1996). Die Sequenz des CE1 TGCCACCGG enthält die essentielle Kernsequenz CCACC (Shen *et al.*, 2004), mit welcher in einem Yeast One Hybrid-Screen auch der TF ORA59 isoliert wurde (Lee *et al.*, 2010). Da ORA59 jedoch nur einmalig isoliert wurde, erfolgten keine weiteren Interaktionsanalysen der Sequenz mit ORA59. Im Gegensatz dazu wurden die TFs ERF1 und ERF15 10 und 12 Mal isoliert, was auf eine effizientere Interaktion dieser TFs mit dem CE1 hindeutet (Lee *et al.*, 2010). In dem Y1H-Screen des CRM-*DJ1E* wurde ERF1 und ERF15 nicht isoliert, wohingegen ORA59 und ERF10 überwiegend selektiert worden sind. Es gibt 18 Untergruppen in der AP2/ERF TF-

Familie, wobei ERF10 zu der Gruppe ERF B1 und ORA59 zur Gruppe ERF B3 gehört (Dietz *et al.*, 2010; Feng *et al.*, 2005). ERF10 reprimiert die CRM-*DJ1E*-vermittelte MAMP-Responsivität (Abbildung 15), während ORA59 die Reporterogenaktivität aktiviert (Abbildung 14). ORA59 wurde, im Gegensatz zu ERF10, schon in verschiedenen Studien intensiv untersucht. So war ORA59 eines von 14 AP2/ERF-Genen, welches nach Jasmonsäure-Behandlung schnell induziert wurde (Pre *et al.*, 2008). Zudem konnte gezeigt werden, dass ORA59 in einem Estradiol-induzierten Expressionssystem nach der Hormon-Behandlung bis zu 86 Gene hochreguliert. Eines dieser 86 Gene ist das *DJ1E*-Gen, was darauf hindeutet, dass es sich bei *DJ1E* um ein direktes Ziel von ORA59 handelt (Pre *et al.*, 2008). Basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, ist die Hochregulierung von *DJ1E* durch die GCCACC-Box des CRM-*DJ1E* bedingt. Gestützt wird diese Vermutung durch eine PatMatch-Analyse (Yan *et al.*, 2005), mit der keine zweite GCCNCC-Bindestelle 500 bp upstream des *DJ1E*-Gens ermittelt wurde.

Wie genau der Transkriptionsfaktor ORA59 und die WT-Box bindenden Proteine (WTBPs) die Genexpression des CRM-*DJ1E* stimulieren, ist noch nicht bekannt. Studien haben gezeigt, dass SA-behandelte, transgene ORA59-Überexpressionspflanzen eine verminderte Akkumulation von ORA59 aufweisen (Van der Does *et al.*, 2013) und die Transkription von ORA59 nach SA-Behandlung herunter reguliert wird (Zander *et al.*, 2014). Im Vergleich dazu wird das CRM-*DJ1E* durch SA induziert (Abbildung 10). Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Genexpression von *DJ1E* unter normalen Wachstumsbedingungen durch ERF10 reprimiert wird. Kommt es zu einer Pathogeninfektion der Pflanze, wird ERF10 vermutlich durch einen Proteinkomplex aus ORA59 und WTBPs ersetzt und es kommt zur Aktivierung der Genexpression. Die Komplexbildung könnte dem SA-vermittelten Abbau von ORA59 entgegen wirken. Um diese Theorie zu fundieren, müssen weitere Untersuchungen erfolgen. Hierzu zählt die Analyse der Genexpression von *DJ1E* in Mutanten, welche die beteiligten TFs betreffen. Ein wichtiger Punkt für die Aufklärung der SA-regulierten Genexpression des CRM-*DJ1E* ist die Identifikation und Analyse des WTBPs.

4.3 Die Funktion des DJ1E im pflanzlichen Immunsystem ist noch weitgehend unerforscht

Das CRM-*DJ1E* ist ein wichtiges regulatorisches Element bei der pathogenabhängigen-Expression des Genes At2g38860. Dieses Gen codiert für das Protein DJ1E, welches zu der Superfamilie DJ-1 gehört. Die DJ-1-Familie ist in verschiedenen Organismen vertreten, wo sie unterschiedliche Funktionen ausführt. Das am besten untersuchte Protein dieser Familie ist das menschliche DJ-1, welches als Deletionsmutante Parkinson verursachen kann (Lev *et al.*, 2007). Zudem gibt es einen Zusammenhang zwischen verschiedenen Krebserkrankungen und dem Expressionslevel von DJ-1 (Kim *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu ist die Funktion der Superfamilie in Pflanzen noch weitgehend ungeklärt (Seo *et al.*, 2012). Es ist bekannt, dass *A. thaliana* sechs Mitglieder der DJ-1 Familie besitzt, die Proteine DJ1A bis F (Kwon *et al.*, 2013). Da die Proteine alle Tandem DJ-1 Domänen besitzen und zudem strukturelle Homologien zu bakteriellen und menschlichen Glyoxalasen aufweisen, wurden sie auch als solche postuliert (Kwon *et al.*, 2013). Tandem DJ-1 Domänen sind notwendig für die Umsetzung von Methylglyoxal und Glyoxal. Jedoch zeigten DJ1C, DJ1E und DJ1F, im Gegensatz zu DJ1A, DJ1B und DJ1D, nur eine geringe bis keine Glyoxalaseaktivität. Dies hängt vermutlich mit dem Fehlen von essentiellen Aminosäuren in der funktionellen Domäne zusammen.

Das DJ1E-Protein ist als Markergen für Seneszenz in *A. thaliana* unter dem Namen YLS5 (*yellow-leaf-specific gene*) bekannt (Yoshida *et al.*, 2001). Für die Induktion der Seneszenz wurden die Hormone ET und Abscisinsäure (ABA) verwendet, wodurch sich die Transkriptionsrate des YLS5 (=DJ1E) nach drei Tagen erhöht hatte.

Die Untersuchung von metabolischen Netzwerken wurde zur Analyse von Koexpressionen verschiedener Gene genutzt. Es wurde angenommen, dass in einem Metabolismus die Gene zeitgleich exprimiert werden. DJ1E wird mit dem Protein PAD3 koexprimiert. Dieses ist an der Bildung des Phytoalexin Camalexin beteiligt, welches aus dem Substrat Tryptophan gebildet wird. Aus diesem Grund wird eine Beteiligung des DJ1E an der Camalexin- oder Tryptophan-Synthese angenommen (Wei *et al.*, 2006). Interessant ist, dass ein *cis*-regulatorisches Modul des PAD3-Promotors eine WT-Box-ähnliche Sequenz enthält (ATACTTTT), wie sie auch Bestandteil des CRM-*DJ1E* ist (GGACTTTT) (Machens *et al.*, 2013; Koschmann *et al.*, 2012).

Die Bedeutung des DJ1E im pflanzlichen Immunsystem ist noch weitgehend unerforscht, es scheint jedoch eine wichtige Rolle in diesem zu spielen. Nach der Induktion mit ET und JA, welches wichtige Regulatoren der pflanzlichen Immunabwehr sind, kommt es zu einem Anstieg der Expressionsrate von *DJ1E* (Yoshida *et al.*, 2001; Pré *et al.*, 2008). Auch nach

der Infektion mit dem Pilz *Peronospora parasitica* (verantwortlich für den Falschen Mehltau) kommt es zu einem Anstieg der Transkriptionsrate von *DJ1E* (Eulgem *et al.*, 2004). Basierend auf Microarray-Daten der GENEVESTIGATOR- und PathoPlant-Datenbanken, ist das *DJ1E*-Gen sowohl unter einer Vielzahl von Biotrophen, als auch Nekrotrophen hochreguliert (Bülow *et al.*, 2007; Zimmermann *et al.*, 2004). Das *cis*-regulatorische Modul von *DJ1E* konnte im Petersilienprotoplastensystem durch das oomycetische MAMP Pep25 induziert werden (Koschmann *et al.*, 2012). Zudem wurde auch im homologen System mittels *Arabidopsis*-Protoplasten eine Induktion durch das bakterielle MAMP flg22 und dem DAMP (*damage-associated molecular pattern*) AtPep1 gezeigt (Hanko, 2013). Auch gab es eine spezifisch erhöhte GUS-Aktivität der 4CRM-*DJ1E::uidA*-Pflanzen nach Infektion mit *B. cinerea* und *P. syringae* um die Infektionsstelle herum (Abbildung 11). Die Induktion durch SA, welches eine entscheidende Rolle bei der Pathogenabwehr einnimmt, ist ein weiteres Indiz für die Bedeutsamkeit des *DJ1E* in der pflanzlichen Immunantwort. ORA59 ist bekannt als ein wichtiger Regulator in der pflanzlichen Immunabwehr (Pre *et al.*, 2008; Zander *et al.*, 2014) und konnte als Aktivator des CRM-*DJ1E* identifiziert werden (Abbildung 14). Es wurde zudem bereits in anderen Arbeiten gezeigt, dass in ORA59-Überexpressionspflanzen das *DJ1E*-Gen hochreguliert wird (Pre *et al.*, 2008). Diese Expressionsanalysen zeigen, dass *DJ1E* für die Pathogenantwort der Pflanzen von entscheidender Bedeutung sein muss.

4.4 Die MRS-At1g13990 liegt in einer außergewöhnlich kurzen intergenischen Region

Das MAMP-responsive *cis*-Element, welches für den synthetischen Promotors 4MRS::*uidA* verwendet wurde (Abbildung 18), liegt in der 101 bp-intergenischen Region upstream des At1g13990-Gens und downstream von At1g13980. Das Gen At1g13990 codiert für ein Protein mit unbekannter Funktion (Theologis *et al.*, 2000; Krishnakumar *et al.*, 2015). Im Gegensatz zu der Mehrheit von "head-to-tail"-angeordneten intergenischen Regionen von zwei benachbarten Genen (958 bp; Korkuc *et al.*, 2014), ist die 101 bp lange Region relativ kurz. Es ist nur wenig über regulatorische Sequenzen in solch kurzen intergenischen Regionen bekannt, somit sind die Untersuchungen der MRS im nativen Promotorkontext wichtig für deren Verständnis. Die 35 bp lange MRS ist für eine MAMP-Responsivität im nativen Promotorkomplex des At1g13990 ausreichend (Abbildung 19). Neben der MRS hat die 3'UTR des upstream liegenden Gens einen positiven Effekt auf die MAMP-repsponsive Genexpression (Abbildung 19). Die Beteiligung von 3'UTRs bei der transkriptionellen Regulation der Genexpression stimmt mit anderen Studien überein (Dean *et al.*, 1989). Im Falle des hier untersuchten At1g13990-Gens, könnte es sich deshalb auch um eine Überlappung des Promotors mit dem 3'UTR des vorliegenden Gens handeln. In

Verteilungsanalysen von putativ regulatorischen Sequenzen konnte gezeigt werden, dass in den meisten Genen 500 bp upstream ausreichend für die Regulation der Expression sind (Yamamoto *et al.*, 2007; Korkuc *et al.*, 2014). Die Beteiligung des 3'UTRs des forderen Gens scheint somit bei einer solch kurzen intergenischen Region nicht unerwartet.

Um die Regulation der MRS besser verstehen zu können, wurde eine Mutations- und Transkriptionsfaktoranalyse durchgeführt. Durch die Mutationsanalyse wurde deutlich, dass vermutlich die ganze MRS erforderlich für eine vollständige MAMP-Responsivität ist (Abbildung 21). Feinere Mutationen ergaben eine 10 bp lange Sequenz, welche die für die MAMP-Responsivität essentielle Sequenz TCGTTTACGT enthält (Abbildung 21 und Abbildung 22). Aufgrund der hohen Hintergrundaktivität des MRS-Bait-Stammes, konnte kein Y1H-Screen mit der TF-only Library durchgeführt werden. Ein Grund hierfür könnte die in der MRS liegende Sequenz TTACGTCA sein, welche eine hohe Ähnlichkeit zu einer *Saccharomyces cerevisiae* Transkriptionsfaktor-Bindestelle TGACGTCA aufweist. Es ist bekannt, dass der Hefe-Transkriptionsfaktor Sko1 mit dieser Bindestelle interagiert (Proft *et al.*, 2005), wodurch ein starkes Hintergrundwachstum verursacht wird.

Da mittels experimenteller Untersuchungen kein Transkriptionsfaktor isoliert werden konnte, wurde eine bioinformatische Analyse der MRS vorgenommen. Diese ergab, dass die essentielle MAMP-responsive Sequenz Ähnlichkeiten zu einer NAC TF-Bindestelle aufweist. Auch wenn die derzeitige Datenbank AthaMap die Interaktion von nur einen NAC Transkriptionsfaktor aufzeigt, sagen die Daten von Proteinbindungs-Microarrays eine Interaktion von NAC46, 55 und 58 mit der Sequenz TCGTTTACGT voraus (Franco-Zorrilla *et al.*, 2014). Die Haupterkennungssequenzen der NACs lautet CGT (G/A) und CACG (Tran *et al.*, 2004; Simpson *et al.*, 2003).

Die bioinformatische Analyse sagt zudem die Interaktion der MRS-At1g13990 mit bZIP-TFs voraus (Abbildung 24). Die Sequenz zeigt Ähnlichkeiten zu dem ocs-Element (TGACG(T/C)AAG(C/G)(G/A)(A/C)T(G/T)ACG(T/C)(A/C)(A/C); Bouchez *et al.*, 1989), das in Promotoren von Abwehr/Stress-Genen vorkommt (Foley und Singh, 2004). Es wird von ocs-bindenden Faktoren (OBFs) gebunden, welche zu der bZIP TF-Familie gehören. Bei OBFs handelt es sich um die TGA-Transkriptionsfaktoren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass At1g13990 durch das Phytoprostane Typ A (PPA) und den JA-Vorläufer 12-oxo-Phytodiensäure (OPDA) induziert wird (Müller *et al.*, 2008). Beide gehören zu den 'reactive electrophile species' (RES), welche an der Aktivierung von Abwehrgenen beteiligt sind (Alméras *et al.*, 2003). Bei *tga256*-Mutanten konnte keine Induktion von At1g13990 durch OPDA und PPA mehr festgestellt werden (Müller *et al.*, 2008). Somit scheinen diese TGAs an der RES-vermittelten Regulation des At1g13990 beteiligt zu sein. Falls es sich um eine direkte Aktivierung handelt, spielt die MRS-At1g13990 eine entscheidende Rolle, da die

MRS-At1g13990 die einzige ähnliche TGA-bindende Sequenz im gesamten Promotor enthält.

NAC096 und bZIP-type Transkriptionsfaktoren sind an der Regulation der Genexpression bei Dehydration und osmotischen Stress beteiligt (Xu *et al.*, 2013). Interessanterweise zeigen PathoPlant-Microarray Expressionsanalysen des At1g13990 eine starke Hochregulierung bei osmotischen Stress sowie Trockenstress (Bülow *et al.*, 2007). Die MRS könnte somit auch an der Genregulation bei abiotischem Stress beteiligt sein.

4.5 Die Multimerisierung von *cis*-Elementen erhöht die Pep25-Responsivität

Die Expressions- und Induktionsstärke von synthetischen Promotoren ist stark abhängig von der Anzahl und dem Abstand der im Promotor enthaltenen *cis*-Elemente (Rushton *et al.*, 2002). In früheren Untersuchungen konnte schon ein positiver Effekt der Multimerisierung von *cis*-Elementen auf die induzierte Reporterogenaktivität festgestellt werden (Rushton *et al.*, 2002). Auch die in dieser Arbeit durchgeführten Multimerisierungen der Elemente CRM-DJ1E und MRS-At1g13990 weisen eine Erhöhung der MAMP-responsiven Reporterexpression auf (Abbildung 8, Abbildung 20). Jedoch ist bei den Tetrameren, im Gegensatz zu den Dimeren, auch eine verminderte Induktion bedingt durch eine erhöhte Basalaktivität zu verzeichnen. Dies unterstützt die Hypothese, dass weniger Kopien eines Elementes eventuell besser für eine Pathogen-spezifische Induzierbarkeit in Pflanzen geeignet sind (Rushton *et al.*, 2002, Gurr und Rushton, 2005). Dennoch werden Tetramere häufig in synthetischen Promotoren für die Identifikation und Analyse von *cis*-Elemente eingesetzt (Liu *et al.*, 2011; Koschmann *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2015), da durch die stärkere Reporterogenaktivität eine Induktionen besser identifiziert werden kann. Die Basalaktivität und die damit verbundene Induktionsstärke spielt an dieser Stelle eine zweitrangige Rolle. Jedes Element verhält sich unterschiedlich in der Multimerisierung, denn die jeweiligen *cis*-Elemente können verschiedene Eigenschaften besitzen. So könnte ein *cis*-Element mit einem Transkriptionsfaktor interagieren, welcher in der nativen Zelle nur bis zu einen gewissen Schwellenwert vorliegt. Bei der Multimerisierung desselben *cis*-Elementes könnte die Kopienzahl der Bindestellen die Anzahl der interagierenden TFs übersteigen, wodurch so die Transkription verringert werden würde (Hernandez-Garcia und Finer, 2014). Aus diesem Grund sollte die Kopienzahl für jedes Element individuell bestimmt werden. Da im Multimer der Abstand zwischen den Elementen wesentlich geringer ist als im nativen Promotorkomplex, könnte es auch zu Problemen bei der Bildung des Protein-DNA-Komplexes kommen, wodurch die Transkription gestört wird (Hernandez-Garcia und Finer, 2014).

4.6 Das CRM-*DJ1E* ist ein geeignetes *cis*-Element für die Entwicklung Pathogen-resistenter Pflanzen

Eine präzise Steuerung der transgenen Expression ist ein wichtiger Punkt bei der Entwicklung von Pflanzen mit erhöhter Resistenz gegenüber Krankheiten (Gurr und Rushton, 2005). Pathogen-responsive *cis*-Elemente sind hierbei von entscheidender Bedeutung, da sie zum Design Pathogen-responsiver, synthetischer Promotoren verwendet werden. Diese können genutzt werden, um gezielt *R*-Gene und dazugehörige *Avr*-Gene zu exprimieren, da eine konstitutiv exprimierte Expression beider Gene meist zum Absterben der Pflanze führt (Dangl *et al.* 1996, Honée 1999). Dabei sollte die Expression des *Avr*-Gens Pathogen-spezifisch reguliert und das entsprechende *R*-Gen konstitutiv exprimiert werden. Nachdem das *Avr*-Genprodukt erkannt wurde, kommt es zu einer hypersensitiven Reaktion in der Pflanze (de Wit, 1992). Eine Alternative zu dem *Avr/R*-Gen-Modell ist die Expression Zelltod-vermittelnder Proteine (Niemeyer *et al.*, 2013).

Wichtig bei diesem Vorhaben ist Verwendung von lokal und spezifisch exprimierenden, synthetischen Promotoren. Die MRS-At1g13990 zeigt eine zu hohe Basalaktivität und die Pathogen-induzierte Expression des Reportergens ist im Vergleich zum CRM-*DJ1E* nicht präzise um die Infektionsstelle lokalisiert (Vergleiche Abbildung 23 mit Abbildung 11). Das CRM-*DJ1E* zeigt in stabil transformierten *A. thaliana*-Pflanzen eine spezifisch und lokal Pathogen-induzierte Genexpression, sowohl bei *P. syringae* als auch bei *B. cinerea* (Abbildung 11). Auch die Basalaktivität ist sehr niedrig im Gegensatz zur MRS-At1g13990. Somit wäre das CRM-*DJ1E* ein geeignetes *cis*-Element für die Entwicklung Pathogen-resistenter Pflanzen. Es könnte für die Expression von *Avr*-Genen sowie Zelltod-vermittelnder Proteine eingesetzt werden.

5 Zusammenfassung

Microbe-associated molecular pattern (MAMP) sind zum Beispiel Moleküle von Pathogenen, die bei Pflanzen eine durch *cis*-regulatorische Sequenzen vermittelte Hochregulation von Abwehrgenen bewirken. Grundlage der vorliegenden Arbeit war die vorangegangene Identifizierung neuer MAMP-responsiver *cis*-Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana*. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die funktionelle Analyse der zwei stärksten MAMP-responsiven *cis*-Elemente. Dabei handelt es sich zum einen um das *cis*-regulatorische Modul (CRM) des *DJ1E*-Gens und zum anderen um die MAMP-responsive Sequenz (MRS) des At1g13990-Gens.

Das CRM-*DJ1E* ist essentiell für die MAMP-responsive Genexpression des Gens *DJ1E*. Es enthält drei funktionelle MAMP-responsive *cis*-Sequenzen, zwei WT-Boxen GGACTTTT und GGACTTTG sowie eine GCC-ähnliche Box GCCACC. Das CRM-*DJ1E* ist Salizylsäure (SA)-responsiv, wobei die GGACTTTT-Box essentiell ist. Die GGACTTTG und GCCACC-Box sind notwendig für die volle SA-Induktion. Die in dieser Arbeit identifizierten AP2/ERF-Transkriptionsfaktoren (TF) ORA59 und ERF10 interagieren antagonistisch mit der GCC-ähnlichen Box des CRM-*DJ1E*, wobei es sich bei ORA59 um einen Aktivator und bei ERF10 um einen Repressor handelt. Die Kernsequenz GCCNCC ist für die Interaktion mit ORA59 essentiell. TF die mit den WT-Boxen interagieren konnten nicht identifiziert werden.

Die MRS-At1g13990 liegt in einer außergewöhnlich kurzen intergenischen Region. Sie ist für eine MAMP-vermittelte Genexpression von At1g13990 ausreichend, wobei die 3'UTR des *upstream* liegenden Gens noch zusätzlich einen quantitativen Effekt aufweist. Die MRS-At1g13990 enthält eine 10 bp lange, für die MAMP-Responsivität essentielle Kernsequenz TCGTTTACGT. Für eine voll ausgeprägte MAMP-vermittelte Genexpression ist jedoch die gesamte MRS nötig. Bioinformatische Analysen sagen eine Interaktion der essentiellen Kernsequenz mit NAC-TF voraus. Umliegende Nukleotide werden vermutlich durch bZIP-Faktoren gebunden.

Die Multimerisierung beider Sequenzen, des CRM-*DJ1E* und der MRS-Atg13990, führt zu einem linearen Anstieg der MAMP-vermittelten Genexpression. Bei der MRS-At1g13990 erhöht sich zusätzlich die MAMP-unabhängige Genexpression.

In transgenen *A. thaliana*-Pflanzen vermittelt das CRM-*DJ1E* sowie die MRS-At1g13990 Pathogen-induzierte Reportergenaktivität gegenüber einem virulenten und avirulenten *Pseudomonas syringae* Stamm und dem nekrotrophen Pilz *Botrytis cinerea*. Die beiden *Pseudomonas* Stämme zählen zu den biotrophen bzw. hemi-biotrophen Pathogenen. Die erhöhte Basalaktivität der MRS-At1g13990 demonstriert die niedrige Spezifität des

synthetischen Promotors. Im Vergleich dazu ist die Pathogen-induzierte Reportergenexpression der transgenen CRM-*DJ1E*-Pflanzen präzise um die Infektionsstelle lokalisiert. Es ist kaum eine Hintergrundexpression zu erkennen. Somit ist dieses Element vermutlich geeignet für die Entwicklung Pathogen-resistenter Pflanzen, bei denen es zu einer Induktion von Zelltod-vermittelnder Gene kommt. Für das bessere Verständnis der Wirkungsweise dieses Elementes ist eine Identifikation der übrigen WT-Box-bindenden TF von Vorteil.

6 Literaturverzeichnis

Ahrendt, S.A. (2014). Mutationsanalyse eines ERF94-responsiven *cis*-Elementes aus *Arabidopsis thaliana*. Bachelorarbeit, Technische Universität Braunschweig.

Alméras, E., Stolz, S., Vollenweider, S., Reymond, P., Mène-Safrané, L. and Farmer, E. E. (2003). Reactive electrophile species activate defense gene expression in *Arabidopsis*. *Plant J.*, **34**, 205–216.

Ballas, N., Wong, L.M., Ke, M., Theologis, A. (1995). Two auxin-responsive domains interact positively to induce expression of the early indoleacetic acid– inducible gene PS-IAA4/5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 3483–3487

Becker, D., Kemper, E., Schell, J., Masterson, R. (1992). New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Mol. Biol.* **20**, 1195–1197.

Belkhadir, Y., Subramaniam, R., Dangl, J.L. (2004). Plant disease resistance protein signalling: NBS-LRR proteins and their partners. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 391–399

Bent, A.F., Mackey, D. (2007). Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu. Rev. Phytopathol.* **45**, 399-436.

Bolivar, J.C., Machens, F., Brill, Y., Romanov, A., Bülow, L. and Hehl, R. (2014). ‘In silico expression analysis’, a novel PathoPlant web-tool to identify abiotic and biotic stress conditions associated with specific *cis*-regulatory sequences. *Database (Oxford)*, **2014**, bau030.

Bouchez, D., Tokuhisa, J.G., Llewellyn, D.J., Dennis, E.S., & Ellis, J.G. (1989). The ocs-element is a component of the promoters of several T-DNA and plant viral genes. *EMBO J.* **8**, 4197–4204.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.

Bülow, L., Steffens, N.O., Galuschka, C., Schindler, M., Hehl, R. (2006). AthaMap: from in silico data to real transcription factor binding sites. *In Silico Biol.* **6**, 243–252.

Bülow, L., Schindler, M. and Hehl, R. (2007). PathoPlant: a platform for microarray expression data to analyze co-regulated genes involved in plant defense responses. *Nucleic Acids Res.* **35**, D841–D845.

- Bülow, L., Engelmann, S., Schindler, M., Hehl, R.** (2009). AthaMap, integrating transcriptional and post-transcriptional data. *Nucleic Acids Res.* **37**, D983–D986.
- Che, D., Jensen, S., Cai, L., Liu, J.S.** (2005). BEST: binding-site estimation suite of tools. *Bioinformatics* **21**, 2909–2911.
- Christaller, L.E.** (2014). Aktivierungs und Bindungsanalysen einer *cis*-regulatorischen Sequenz mit WRKY70. Bachelorarbeit, *Technische Universität Braunschweig*.
- Clough, S.J. und Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 735–743.
- Coutu, C., Brandle, J., Brown, D., Brown, K., Miki, B., Simmonds, J., Hegedus, D.D.** (2007). pORE: a modular binary vector series suited for both monocot and dicot plant transformation. *Transgenic Res.* **16**, 771–781.
- Dangl J.L., Dietrich R.A., Richberg M.H.** (1996). Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* **8**, 1793–1807.
- Dangl, J.L., Ritter, C., Gibbon, M.J., Mur, L.A., Wood, J.R., Goss, S., Mansfield, J., Taylor, J.D., Vivian, A.** (1992). Functional homologs of the *Arabidopsis* RPM1 disease resistance gene in bean and pea. *Plant Cell* **4**, 1359–1369.
- Davuluri, R.V., Sun, H., Palaniswamy, S.K., Matthews, N., Molina, C., Kurtz, M., Grotewold, E.** (2003). AGRIS: *Arabidopsis* Gene Regulatory Information Server, an information resource of *Arabidopsis cis*-regulatory elements and transcription factors. *BMC Bioinformatics* **4**, 25.
- Danhorn, T., Fuqua, C.** (2007). Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **61**, 401–422.
- Dean, C., Favreau, M., Bedbrook, J., Dunsmuir, P.** (1989). Sequences 5' to translation start regulate expression of petunia *rbcS* genes. *Plant Cell* **1**, 209–215.
- Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M., Leemans, J.** (1985). Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res.* **13**, 4777–4788.
- De Vos, M., Zaanen, W.V., Koornneef, A., Korzelius, J.P., Dicke, M., Van Loon, L.C., Pieterse, C.M.J.** (2006). Herbivore-induced resistance against microbial pathogens in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **142**, 352 – 363.

- de Wit** (1992). Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **30**, 391-418.
- Dietz, K.J., Vogel, M.O., Viehhauser, A.** (2010). AP2/EREBP transcription factors are part of gene regulatory networks and integrate metabolic, hormonal and environmental signals in stress acclimation and retrograde signalling. *Protoplasma* **245**, 3–14.
- Dong, J., Chen, C., Chen, Z.** (2003). Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Mol. Biol.* **51**, 21 – 37.
- Dong, X** (2004). NPR1, all things considered. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**, 547 – 552.
- Eulgem, T., Weigman, V.J., Chang, H.-S., McDowell, J.M., Holub, E.B., Glazebrook, J., Zhu, T., Dangl, J.L.** (2004). Gene Expression Signatures from Three Genetically Separable Resistance Gene Signaling Pathways for Downy Mildew Resistance. *Plant Physiol.* **135**, 1129 – 1144.
- Feng, J.X., Liu, D., Pan, Y., Gong, W., Ma, L.G., Luo, J.C., Deng, X.W. and Zhu, Y.X.** (2005). An annotation update via cDNA sequence analysis and comprehensive profiling of developmental, hormonal or environmental responsiveness of the *Arabidopsis* AP2/EREBP transcription factor gene family. *Plant Mol. Biol.* **59**, 853–868.
- Foley, R.C., Singh, K.B.** (2004). TGA5 acts as a positive and TGA4 acts as a negative regulator of ocs element activity in *Arabidopsis* roots in response to defence signals. *FEBS Lett.* **563**, 141-145
- Franco-Zorrilla, J.M., López-Vidriero, I., Carrasco, J.L., Godoy, M., Vera, P., Solano, R.** (2014). DNA-binding specificities of plant transcription factors and their potential to define target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **111**, 2367–2372.
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H., Ryals, J.** (1993). Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* **261**, 754–756.
- Galuschka, C., Schindler, M., Bülow, L., Hehl, R.** (2007). AthaMap web tools for the analysis and identification of co-regulated genes. *Nucleic Acids Res.* **35**, D857–D862.
- Gietz, R.D. und Schiestl, R.H.** (2007). High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat. Protoc.* **2**, 31–34.
- Gilmartin, P.M., Sarokin, L., Memelink, J., Chua, N.H.** (1990). Molecular light switches for plant genes. *Plant Cell* **2**, 369–378

- Głowacki, S., Macioszek, V. & Kononowicz, A.** (2011). R proteins as fundamentals of plant innate immunity. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **16**, 1-24.
- Gonzalez, L.** (2015). Analyse der Multimerisierung eines Pep25-responsiven *cis*-Elementes aus *Arabidopsis thaliana*. Bachelorarbeit, *Technische Universität Braunschweig*.
- Gurr, S.J. und Rushton, P.J.** (2005). Engineering plants with increased disease resistance: how are we going to express it? *Trends Biotechnol.* **23**, 283–290.
- Hanko, E.K.R.** (2013). Untersuchung *cis*-regulatorischer Sequenzen in *Arabidopsis thaliana*. Bachelorarbeit, *Technische Universität Braunschweig*.
- He, P., Shan, L., Sheen, J.** (2007). Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant–microbe interactions. *Cell. Microbiol.* **9**, 1385–1396.
- Heath, M.C.** (2000). Hypersensitive response-related death. *Plant Mol. Biol.* **44**, 321–334.
- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M., Korenaga, T.** (1999). Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: *Nucleic Acids Res.* **27**, 297–300.
- Hernandez-Garcia, C.M., Finer, J.J.** (2014). Identification and validation of promoters and *cis*-acting regulatory elements. *Plant Sci.* **217–218**, 109–119.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W.** (1987). GUS fusions: β glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**, 3901–3907.
- Jones, J.D.G., Dangl, J.L.** (2006). The plant immune system. *Nature* **444**, 323–329.
- Kanofsky, K.** (2014). Hormoneller Einfluss auf ein *cis*-regulatorisches Modul aus dem Promotor des *DJ1E* Gens. Masterarbeit, *Technische Universität Braunschweig*.
- Kendrick, M.D. und Chang, C.** (2008). Ethylene signaling: new levels of complexity and regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**, 479 – 485.
- Kim, R.H., Peters, M., Jang, Y., Shi, W., Pintilie, M., Fletcher, G.C., et al.** (2005). DJ-1, a novel regulator of the tumor suppressor PTEN. *Cancer Cell* **7**, 263–273.
- Kirsch, C., Takamiya-Wik, M., Schmelzer, E., Hahlbrock, K., Somssich, I.E.** (2000). A novel regulatory element involved in rapid activation of parsley ELI7 gene family members by fungal elicitor or pathogen infection. *Mol. Plant Pathol.* **1**, 243–251.
- Koornneef, A., Leon-Reyes, A., Ritsema, T., Verhage, A., Den Otter, F. C., Van Loon, L. C., Pieterse, C. M. J.** (2008). Kinetics of salicylate-mediated suppression of jasmonate signaling reveal a role for redox modulation. *Plant Physiol.* **147**, 1358 – 1368.

- Kooshki, M., Mentewab, A., Stewar, C. N., Jr** (2003). Pathogen inducible reporting in transgenic tobacco using a GFP construct. *Plant Science* **165**, 213 – 219.
- Korkuc, P., Schippers, J.H.M, Walther, D.** (2014). Characterization and identification of *cis*-regulatory elements in *Arabidopsis* based on single-nucleotide polymorphism information. *Plant Physiol.* **164**, 181-200.
- Koschmann, J., Machens, F., Becker, M., Niemeyer, J., Schulze, J., Bülow, L., Stahl, D.J., Hehl, R.** (2012). Integration of bioinformatics and synthetic promoters leads to the discovery of novel elicitor-responsive *cis*-regulatory sequences in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **160**, 178–191.
- Krishnakumar V., Hanlon M.R., Contrino S., Ferlanti E.S., Karamycheva S., Kim M., Rosen B.D., Cheng C.-Y., Moreira W., Mock S.A., Stubbs J., Sullivan J.M., Krampis K. Miller J.R., Micklem G., Vaughn M., Town C.D.** (2015). Araport: the *Arabidopsis* Information Portal. *Nucleic Acids Res.* **43**, D1003-D1009
- Kwon, K., Choi, D., Hyun, J.K., Jung, H.S., Baek, K., Park, C.** (2013). Novel glyoxalases from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS J.* **280**, 3328–3339.
- Lee, S.J., Park, J.H., Lee, M.H., Yu, J.H., Kim, S.Y.** (2010). Isolation and functional characterization of CE1 binding proteins. *BMC Plant Biol.* **10**, 277.
- Lev, N., Roncevic, D., Ickowicz, D., Melamed, E., Offen, D.** (2007). Role of DJ-1 in Parkinson's disease. *J. Mol. Neurosci.* **31**, 307.
- Li, J., Brader, G., Kariola, T., Palva, E.T.** (2006). WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense. *Plant J.* **46**, 477–491.
- Liu, W., Mazarei, M., Rudis, M.R., Fethe, M.H., Stewart, C.N.** (2011). Rapid in vivo analysis of synthetic promoters for plant pathogen phytosensing. *BMC Biotechnology* **11**, 108.
- Liu, W., Yuan, J.S. and Stewart, C.N. Jr.** (2013). Advanced genetic tools for plant biotechnology. *Nat. Rev. Genet.* **14**, 781–793.
- van de Löcht, U., Meier, I., Hahlbrock, K., Somssich, I.E.** (1990). A 125 bp promoter fragment is sufficient for strong elicitor-mediated gene activation in parsley. *EMBO J.* **9**, 2945–2950.
- Maas, C., Laufs, J., Grant, S., Korfhage, C., Werr, W.** (1991). The combination of a novel stimulatory element in the first exon of the maize Shrunken-1 gene with the following intron 1 enhances reporter gene expression up to 1000-fold. *Plant Mol. Biol.* **16**, 199–207.

- Machens, F., Becker, M., Umrath, F., Hehl, R.** (2014). Identification of a novel type of WRKY transcription factor binding site in elicitor-responsive *cis*-sequences from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **84**, 371–385.
- Mahony, S. and Benos, P.V.** (2007). STAMP: a web tool for exploring DNA-binding motif similarities. *Nucleic Acids Res.* **35**, W253–W258.
- Mazarei, M., Al-Ahmad, H., Rudis, M.R., Stewart, C.N.** (2008). Protoplast isolation and transient gene expression in switchgrass, *Panicum virgatum* L. *Biotechnol. J.* **3**, 354–359.
- Mitsuda, N., Hisabori, T., Takeyasu, K., Sato, M.H.** (2004). VOZ; isolation and characterization of novel vascular plant transcription factors with a one-zinc finger from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell. Physiol.* **45**, 845–854.
- Mitsuda, N., Ikeda, M., Takada, S., Takiguchi, Y., Kondou, Y., Yoshizumi, T., Fujita, M., Shinozaki, K., Matsui, M., Ohme-Takagi, M.** (2010). Efficient yeast one-/two-hybrid screening using a library composed only of transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell. Physiol.* **51**, 2145–2151.
- Moffat, A.S.** (2001). Finding new ways to fight plant disease. *Science* **292**, 2270–2273.
- Mudgett, M.B.** (2005). New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **56**, 509 – 531.
- Mueller, S., Hilbert, B., Dueckershoff, K., Roitsch, T., Krischke, M., et al.** (2008). General detoxification and stress responses are mediated by oxidized lipids through TGA transcription factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**, 768–785.
- Nawrath, C., und Métraux, J.P.** (1999). Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell* **11**, 1393–1404.
- Ni, W., Sewalt, V.J.H., Korth, K.L., Blount, J.W., Balance, C.M., Dixon R.A.** (1996). Stress Responses in Alfalfa. *Plant Physiol.* **112**, 717-726.
- Niemeyer, J., Ruhe, J., Machens, F., Stahl, D.J. and Hehl, R.** (2014). Inducible expression of p50 from TMV for increased resistance to bacterial crown gall disease in tobacco. *Plant Mol. Biol.* **84**, 111–123.
- Nürnberg, T., Brunner, F., Kemmerling, B., Piater, L.** (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews* **198**, 249 – 266.
- Oerke, E.-C.** (2006). Crop losses to pests. *J. Agr. Sci.* **144**, 31–43.

- Ohta, M., Matsui, K., Hiratsu, K., Shinshi, H., Ohme-Takagi, M.** (2001). Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. *Plant Cell* **13**, 1959–1968.
- Oono, Y., Chen, Q.G., Overvoorde, P.J., Köhler, C., Theologis, A.** (1998). Age mutants of *Arabidopsis* exhibit altered auxin-regulated gene expression. *Plant Cell* **10**, 1649–1662.
- Palaniswamy, S.K., James, S., Sun, H., Lamb, R.S., Davuluri, R.V. Grotewold, E.** (2006). AGRIS and AtRegNet. a platform to link cis-regulatory elements and transcription factors into regulatory networks. *Plant Physiol.* **140**, 818–829.
- Park, S.W., Kaimoyo, E., Kumar, D. , Mosher, S., Klessig, D.F.** (2007). Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* **318**, 113–116.
- Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., Van Wees, S.C.M.** (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 308 – 316.
- Pieterse, C.M., van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., van Wees, S.C.** (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **28**, 489–521.
- Perez-Rodriguez, P., Riano-Pachon, D.M., Correa, L.G., Rensing, S.A., Kersten, B., Mueller-Roeber, B.** (2010). PlnTFDB: updated content and new features of the plant transcription factor database. *Nucleic Acids Res.* **38**, D822–D827.
- Pietrzak, M., Burri, M., Herrero, J.-J., Mosbach, K.** (1989). Transcriptional activity is inducible in the cauliflower mosaic virus 35 S promoter engineered with the heat shock consensus sequence. *FEBS Lett.* **249**, 311–315.
- Pre, M., Atallah, M., Champion, A., De Vos, M., Pieterse, C.M., Memelink, J.** (2008). The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant Physiol.* **147**, 1347–1357.
- Proft, M., Gibbons, F.D., Copeland, M., Roth, F.P., Struhl, K.** (2005). Genomewide identification of Sko1 target promoters reveals a regulatory network That operates in response to osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* **4**, 1343–1352
- Pua, E.C., Davey, M.R.** (2010). Plant Developmental Biology - Biotechnological Perspectives Volume 1, Springer
- Puente, P., Wei, N., Deng, X.W.** (1996). Combinatorial interplay of promoter elements constitutes the minimal determinants for light and developmental control of gene expression in *Arabidopsis*. *EMBO J.* **15**, 3732–3743.

- Rebordinos, L., Cantoral, J.M., Prieto, M.V., Hanson, J.R., Collado, I.G.** (1995). The phytotoxic activity of some metabolites of *Botrytis Cinerea*. *Phytochemistry* **42**, 383 – 387.
- Röling, L.** (2015). Funktionelle Analyse eines starken MAMP-responsiven *cis*-Elementes aus *Arabidopsis thaliana*. Bachelorarbeit, Technische Universität Braunschweig.
- Rushton, P.J., Reinstadler, A., Lipka, V., Lippok, B., Somssich, I.E.** (2002). Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen- and wound-induced signaling. *Plant Cell* **14**, 749–762.
- Sambrook, J. und Russell, D.W.** (2001). Molecular cloning. A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press.
- Seo, K.H., Zhuang, N., Cha, J.Y., Son, D., Lee, K.H.** (2012). Crystallization and preliminary X-ray data analysis of a DJ-1 homologue from *Arabidopsis thaliana* (AtDJ-1D). *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **68**, 101–104.
- Shen, Q. und Ho, T.H.** (1995). Functional dissection of an abscisic acid (ABA)- inducible gene reveals two independent ABA-responsive complexes each containing a G-box and a novel *cis*-acting element. *Plant Cell* **7**, 295–307.
- Shen, Q., Zhang, P., Ho, T.H.** (1996). Modular nature of abscisic acid (ABA) response complexes: composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley. *Plant Cell* **8**, 1107–1119.
- Shen, Q.J., Casaretto, J.A., Zhang, P., Ho, T.H.** (2004). Functional definition of ABA-response complexes: the promoter units necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Mol. Biol.* **54**, 111–124.
- Spoel, S. H, Johnson, J. S., Dong, X.** (2007). Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **104**, 18841 – 18847
- Sprenger-Haussels, M. und Weisshaar, B.** (2000). Transactivation properties of parsley proline-rich bZIP transcription factors. *Plant J.* **22**, 1–8.
- Shiu, S.-H. und Bleecker, A. B.** (2001). Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. *Sci. STKE.* **113**, p. re22
- Simpson, S.D., Nakashima, K., Narusaka, Y., Seki, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2003). Two different novel *cis*-acting elements of *erd1*, a *clpA* homologous *Arabidopsis* gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. *Plant J.* **33**, 259–270.

- Staswick, P.E. und Tiryaki, I.** (2004). The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 2117 – 2127.
- Steffens, N.O., Galuschka, C., Schindler, M., Bülow, L., Hehl, R.** (2004). AthaMap: an online resource for in silico transcription factor binding sites in the *Arabidopsis thaliana* genome. *Nucleic Acids Res.* **32**, D368–D372.
- Swarbreck, D., Wilks, C., Lamesch, P., Berardini, T.Z., Garcia-Hernandez, M., Foerster, H., Li, D., Meyer, T., Muller, R., Ploetz, L., Radenbaugh, A., Singh, S., Swing, V., Tissier, C., Zhang, P., Huala, E.** (2008). The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation. *Nucleic Acids Res.* **36**, D1009–D1014.
- Theologis, A., Ecker, J.R., Palm, C.J., Federspiel, N.A., Kaul, S., White, O., et al.** (2000). Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 816–20.
- Tran, L.-S.P., Nakashima, K., Sakuma, Y., Simpson, S.D., Fujita, Y., Maruyama, K., Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2004). Isolation and functional analysis of arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive *cis*-element in the *early responsive to dehydration stress 1* promoter. *Plant Cell* **16**, 2481–2498.
- Tsuda, K. and Somssich, I. E.** (2015). Transcriptional networks in plant immunity. *New Phytologist* **206**, 932–947.
- Van der Does, D., Leon-Reyes, A., Koornneef, A., Van Verk, M.C., Rodenburg, N., Pauwels, L., Goossens, A., Korbes, A.P., Memelink, J., Ritsema, T., Van Wees, S.C., Pieterse, C.M.** (2013). Salicylic acid suppresses jasmonic acid signaling downstream of SCFCOI1-JAZ by targeting GCC promoter motifs via transcription factor ORA59. *Plant Cell* **25**, 744–761.
- Wehrs, M.** (2013). Mutationsanalyse von bioinformatisch identifizierten Pep25-responsiven *cis*-Elementen aus *Arabidopsis thaliana*. Bachelorarbeit, Technische Universität Braunschweig.
- Wei, H., Persson, S., Mehta, T., Srinivasasainagendra, V., Chen, L., Page, G.P., Somerville, C., Loraine, A.** (2006). Transcriptional coordination of the metabolic network in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **142**, 762–774.
- Wiermer, M., Feys, B.J. und Parker, J.E.** (2005). Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 383 – 389.

- Xu, Z.-Y., Kim, S.Y., Hyeon, D.Y., Kim, D.H., Dong, T., Park, Y., Hwang, I.** (2013). The *Arabidopsis* NAC transcription factor ANAC096 cooperates with bZIP-Type transcription factors in dehydration and osmotic stress responses. *Plant Cell* **25**, 4708–4724.
- Xue, G.-P.** (2005). A CELD-fusion method for rapid determination of the DNA-binding sequence specificity of novel plant DNA-binding proteins. *Plant J.* **41**, 638–649
- Xue, G.P., Bower, N.I., McIntyre, C.L., Riding, G.A., Kazan, K., Shorter, R.** (2006). TaNAC69 from the NAC superfamily of transcription factors is up-regulated by abiotic stresses in wheat and recognises two consensus DNA-binding sequences. *Func. Plant Biol.*, **33**, 43–57
- Yamamoto, Y. Y., & Obokata, J.** (2008). ppdb: a plant promoter database. *Nucleic Acids Res.* **36**, 977– 981.
- Yan, T., Yoo, D., Berardini, T.Z., Mueller, L.A., Weems, D.C., Weng, S., Cherry, J.M., Rhee, S.Y.** (2005). PatMatch: a program for finding patterns in peptide and nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res.* **33**, W262–W266.
- Yanagisawa, S. und Schmidt, R.J.** (1999). Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors. *Plant J.* **17**, 209–214.
- Yoo, S.-D., Cho, Y.-H., Sheen, J.** (2007). *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat. Protoc.* **2**, 1565–1572.
- Yoshida, S., Ito, M., Nishida, I., Watanabe, A.** (2001). Isolation and RNA gel blot analysis of genes that could serve as potential molecular markers for leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **42**, 170–178.
- Zander, M., Thurow, C., Gatz, C.** (2014). TGA transcription factors activate the salicylic acid-suppressible branch of the ethylene-induced defense program by regulating ORA59 expression. *Plant Physiol.* **165**, 1671–1683.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., Gruissem, W.** (2004). GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol.* **136**, 2621–2632.
- Zhu, J., Jeong, J. C., Zhu, Y., Sokolchik, I., Miyazaki, S., Zhu, J.-K., Bressan, R.A.** (2008). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 4945–4950.
- Zhu, Z., Gao, J., Yang, J., Wang, X., Ren, G., Ding, Y., Kuai, B.** (2015). Synthetic promoters consisting of defined *cis*-acting elements link multiple signaling pathways to probenazole-inducible system. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* **16**, 253–263.

Zou, C., Sun, K., Mackaluso, J.D., Seddon, A.E., Jin, R., Thomashow, M.F., Shiu, S.H. (2011). *Cis*-regulatory code of stress-responsive transcription in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 14992–14997.

7 Anhang

4CRM-DJ1E

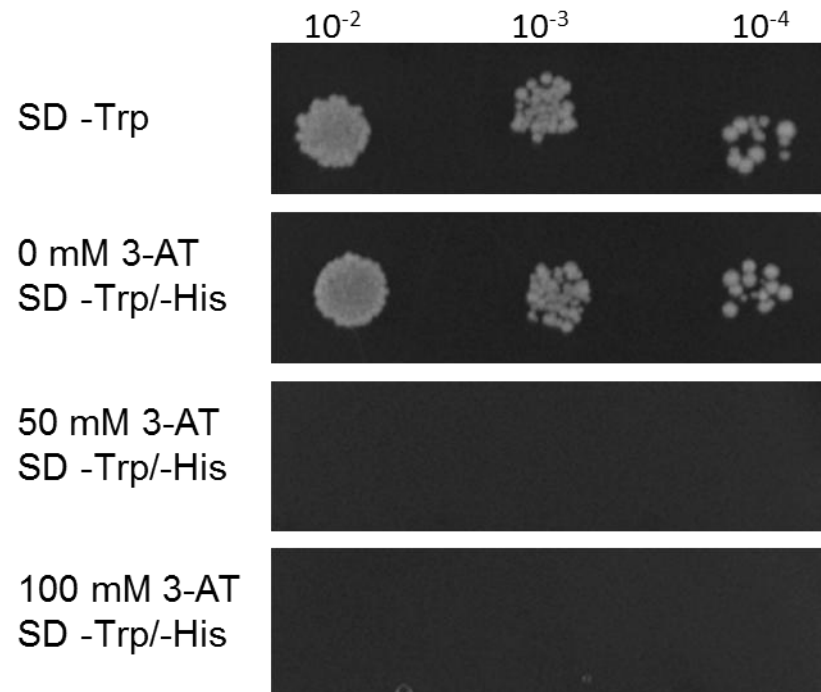


Abbildung 26: 3-AT Test des Bait-Stammes 4CRM-DJ1E. Kein Wachstum ab 50 mM 3-AT

4CRM-DJ1E_w/o_GCC

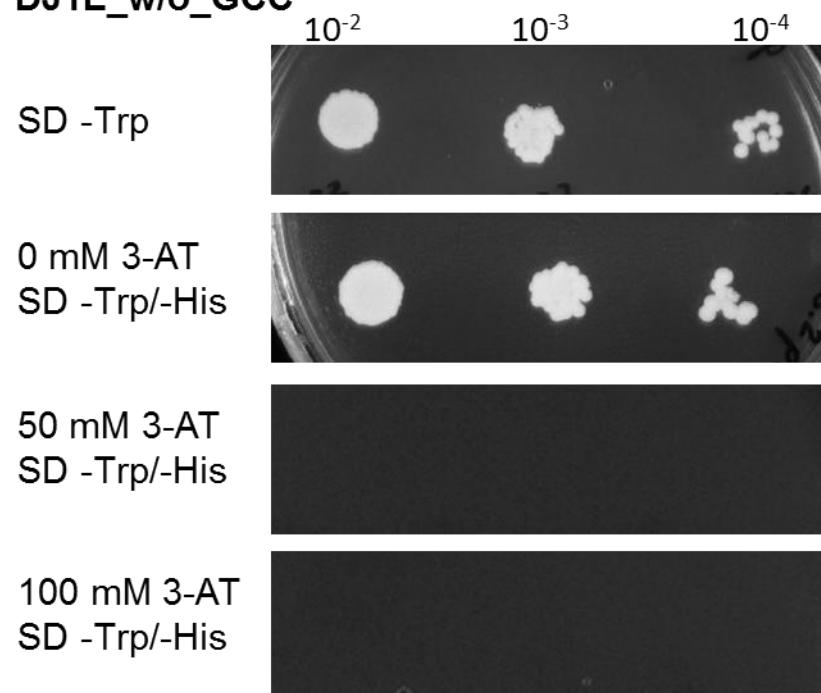


Abbildung 27: 3-AT Test des Bait-Stammes 4CRM-DJ1E_w/o_GCC. Kein Wachstum ab 50 mM 3-AT

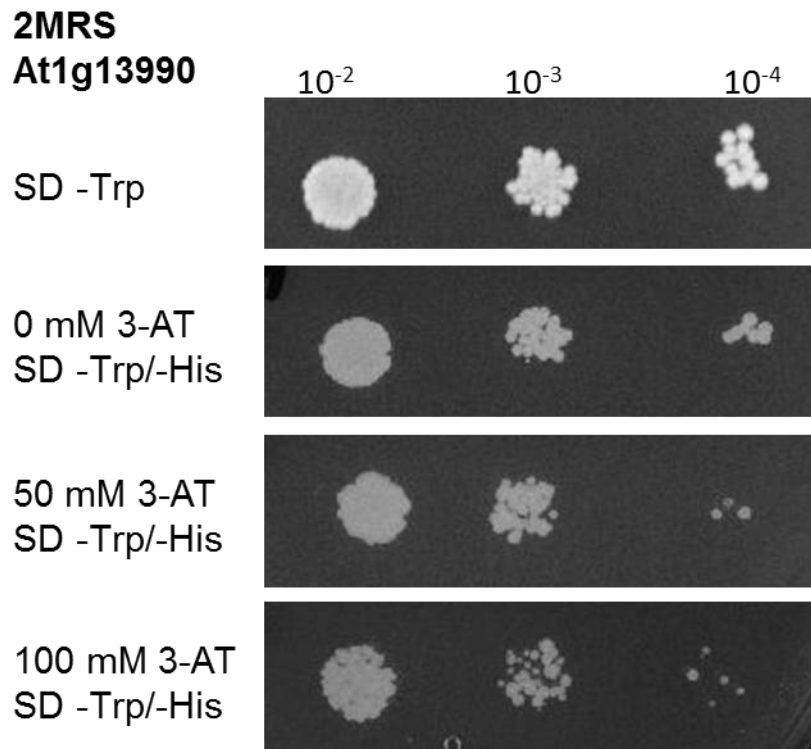


Abbildung 28: 3-AT Test des Bait-Stammes 2MRS-At1g13990. Wachstum bei 50 und 100 mM 3-AT, keine Inhibierung des Hintergrundwachstums möglich

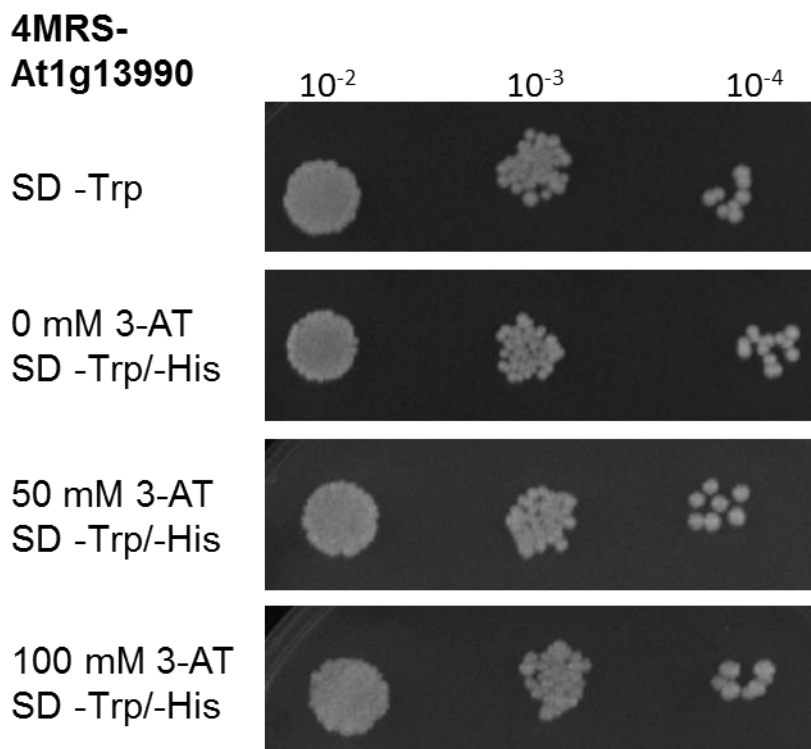


Abbildung 29: 3-AT Test des Bait-Stammes 4MRS-At1g13990. Wachstum bei 50 und 100 mM 3-AT, keine Inhibierung des Hintergrundwachstums möglich

Tabelle 2: Transkriptionsfaktoren der identifizierten Klone des Y1H-Screen mit CRM-DJ1E als Bait-Sequenz.

* ERF10 (At1g03800); ** ORA59 (At1g06160); † MYB96 (At5g62470).

Probennummer	Locus	Name	Familie
1*	At103800	ERF10	AP2/ERF
2*	At103800	ERF10	AP2/ERF
3*	At103800	ERF10	AP2/ERF
4*	At103800	ERF10	AP2/ERF
5	At4g34410	-	AP2/ERF
6 †	At5g62470	MYB96	MYB
7	At4g34410	-	AP2/ERF
8*	At103800	ERF10	AP2/ERF
9*	At103800	ERF10	AP2/ERF
10*	At103800	ERF10	AP2/ERF
11	At2g22750	-	bHLH
12	At5g61590	-	AP2/ERF
13	At3g50870	MNP (MONOPOLE)	C2C2
14	At1g50420	SCL3	GRAS
15	At5g25160	ZFP3	C2H2
16**	At1g06160	ORA59	AP2/ERF
17**	At1g06160	ORA59	AP2/ERF
18 †	At5g62470	MYB96	MYB
19	At5g57660	COL5	C2C2
20	At3g46640	PCL1	MYB
21	At315270	SPL5	SBP
22 †	At5g62470	MYB96	MYB
23	At2g38880	-	-
24*	At1g03800	ERF10	AP2/ERF
25*	At1g03800	ERF10	AP2/ERF
26**	At1g06160	ORA59	AP2/ERF
27	At2g47190	-	MYB
28**	At1g06160	ORA59	AP2/ERF
29**	At1g06160	ORA59	AP2/ERF
30	At1g74840	-	MYB
31	At5g05550	-	-

Tabelle 3: Transkriptionsfaktoren der identifizierten Klone des Y1H-Screen mit dem verkürzten CRM-DJ1E_w/o_GCC als Bait-Sequenz

Probennummer	Locus	Name	Familie
1	At2g22540	AGL22	MADS
2	At3g13445	TBP	-
3	At1g12880	NUDT12	
4	At4g18830	ATOFP5	OFP
5	At5g03790	ATHB51/LMI1	HB
6	At4g33540	-	-
7	At1g28450	AGL58	MADS
8	At1g14490	-	-
9	At3g17600	IAA31 iHOP	AUX/IAA
10	At4g29110	unknown	-
11	At2g36340	-	GeBP
12	At4g16780	ATHB-2	HB
13	At5g53950	CUC2	NAC
14	At2g36340	-	GeBP
15	At5g53200	TRY	MYB-related
16	At4g26030	-	C2H2
17	At5g38490	unknown	-
18	At1g35240	ARF20	ARF
19	At3g46640	PCL1	G2-like
20	At1g51220	WIP5	C2H2
21	At1g10120	-	bHLH
22	At5g65210	TGA1	bZIP
23	At1g10120	-	bHLH
24	At1g43700	VIP1	bZIP
25	At1g74080	MYB122	MYB
26	At2g22200	-	AP2-EREBP
27	At4g30925	unknown	-
28	At5g05550	-	Trihelix
29	At3g15270	SPL5	SBP
30	At1g71520	-	AP2-EREBP
31	At5g24470	pseudo-response	-
32	At5g51230	<i>EMBRYONIC</i>	-

33	At5g17810	WUSCHEL-related	-
34	At5g51230	EMBR. FLOWER 2	-

A

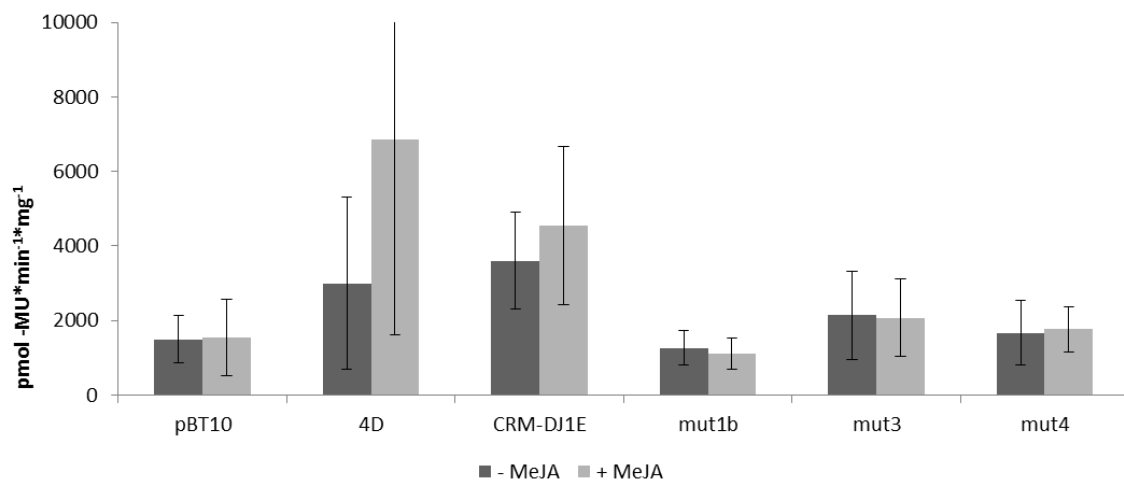
CRM AGGACTTTTCACCAGTTGGACTTTGAAGCCACCAA

mut1a GAAGTCC-----

mut3 -----AGTCCCA-----

mut4 -----GGATTGTTGG

B



C

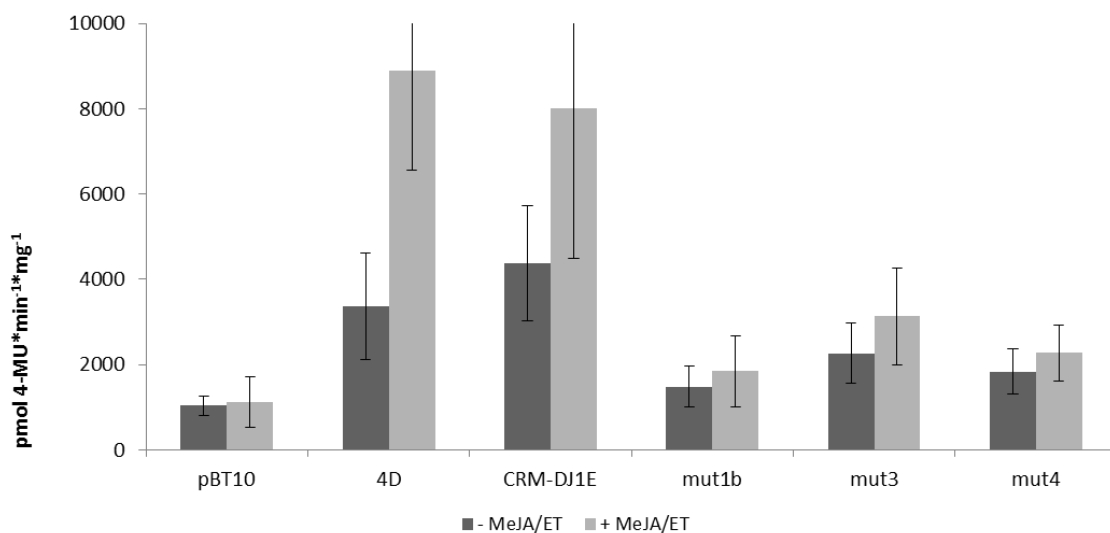


Abbildung 30: Hormon-vermittelte Reportergenaktivität des CRM-DJ1E und mut1b, 3 und 4

A: Mutationen mut1b, 3 und 4 im Vergleich zur Wildtypsequenz. B/C: Transiente Reportergen-Assays der Mutanten 1b, 3 und 4 des CRM-DJ1E im Vergleich zur Wildtypsequenz. Alle Konstrukte wurden als Tetramer im pBT10GUS-d35SLUC-Vektor getestet (Koschmann *et al*, 2012). B: Verglichen werden MeJA-unbehandelte und -behandelte Proben. C: Verglichen werden MeJA/ET-unbehandelte und -behandelte Proben.

Tabelle 4: Relative GUS-Werte der nativen Promotoranalyse des *DJ1E*-Gens (pmol 4-MU·min⁻¹·mg⁻¹; Werte zu Abbildung 7)

Labor	Konstrukt	Experiment	- Pep25	Mittelwert	Std. abw.	+ Pep25	Mittelwert	Std. abw.	Signifikanz
	pBT10	1	1421,86	1383,69	273,44	1137,89	1227,52	861,71	0,611
			949,39			1029,60			
		2	1624,06			3188,26			
			1251,51			1408,06			
		3	1250,01			61,28			
			1190,55			1171,96			
		4	1171,02			948,90			
			1340,67			23,70			
		5	1844,33			2005,97			
			1793,47			1299,59			
	4D	1	2733,21	4199,01	1907,23	56544,02	79200,07	31473,27	0,000
			3375,76			39051,40			
		2	3816,60			70667,87			
			6282,52			63202,77			
		3	1808,28			18508,43			
			2671,43			13875,89			
		4	3372,79			58760,41			
			5752,83			127698,26			
		5	-			70572,56			
			7977,65			87544,40			
126bp-Prom_S15	DJ1E-126::uidA	1	377,05	678,69	152,80	1654,61	1720,05	115,29	0,000
			714,46			1671,93			
		2	827,68			1620,75			
			706,20			1681,76			
		3	621,21			1968,69			
			825,51			1722,54			
161bp-Prom_S15	DJ1E-161::uidA	1	1047,45	1156,36	519,13	4302,73	9360,94	4388,00	0,000
			474,13			4374,30			
			1943,82			14030,04			
		2	724,83			4673,63			
			1056,39			6162,84			
			2150,75			16791,80			
		3	833,07			10143,97			
			967,37			11516,38			
			1209,43			12252,75			
			300bp-Prom_S15			DJ1E-300::uidA			
280,00	3851,10								
261,57	4698,68								
2	473,50	15555,25							
	355,97	11963,02							
	656,59	-							
3	485,47	14258,79							
	855,64	12542,24							
	602,66	8576,14							
Signifikanzen zueinander									
126/161	0.002	126/300	0.000	161/300	0.504				

Tabelle 5: Normalisierte GUS-Werte der Transformation des Mono-, Di- und Tetramers vom CRM-DJ1E (pmol 4-MU·min⁻¹·mg⁻¹, Werte zu Abbildung 8)

Labor	Konstrukt	Experiment	- Pep25	Mittelwert	Std. abw.	+ Pep25	Mittelwert	Std. abw.	Signifikanz
	pBT10	1	1421,86	1383,69	273,44	1137,89	1227,52	861,71	0,611
			949,39			1029,60			
		2	1624,06			3188,26			
			1251,51			1408,06			
		3	1250,01			61,28			
			1190,55			1171,96			
		4	1171,02			948,90			
			1340,67			23,70			
		5	1844,33			2005,97			
			1793,47			1299,59			
	4D	1	2733,21	4199,01	1907,23	56544,02	79200,07	31473,27	0,000
			3375,76			39051,40			
		2	3816,60			70667,87			
			6282,52			63202,77			
		3	1808,28			18508,43			
			2671,43			13875,89			
		4	3372,79			58760,41			
			5752,83			127698,26			
		5	-			70572,56			
			7977,65			87544,40			
1xS15	1CRM-DJ1E	1	4547,78	7081,02	3248,30	29450,44	23798,89	6170,23	0,011
			4237,34			15215,29			
		2	12343,04			-			
			7195,90			26730,96			
2xS15	2CRM-DJ1E	1	7061,40	7280,62	2779,26	87000,02	66223,27	14815,23	0,001
			3994,23			58176,18			
		2	11670,10			-			
			6396,76			53493,61			
4xS15	4CRM-DJ1E	1	22256,71	12139,74	6932,90	64661,05	95463,20	21083,74	0,001
			5111,86			108440,20			
		2	14822,79			120219,60			
			6367,60			88531,94			

Tabelle 6: Normalisierte GUS-Werte der Transformation des CRM-DJ1E und mut1-4 induziert mit Pep25 (pmol 4-MU-min⁻¹·mg⁻¹, Werte zu Abbildung 9)

Labor	Konstrukt	Experiment	- Pep25	Mittelwert	Std. abw.	+ Pep25	Mittelwert	Std. abw.	Signifikanz
BA M. Wehrs	pBT10	1	857,30	1289,10	521,26	958,33	1388,98	261,62	0,777
			902,15			1518,41			
		2	2154,28			1654,04			
			1242,68			1425,12			
BA M. Wehrs	4D	1	46565,30	4034,29	2932,59	133977,29	143578,21	9841,95	0,002
			2592,27			72709,36			
		2	7725,59			133977,29			
			9510,61			157105,80			
S15	4CRM-DJ1E	1	6619,42	7485,57	1284,57	94856,65	109402,45	11153,26	0,000
BA M. Wehrs			6710,53			111868,73			
		2	6909,23			105269,69			
			9703,09			125614,75			
S15mut4	mut1	1	8479,03	12686,42	2016,03	27424,36	24875,49	4666,92	0,003
			14972,43			44889,30			
			11617,01			29657,48			
			14032,19			28435,51			
		2	12558,57			22638,36			
			12346,17			22548,63			
			12282,26			15387,92			
			15203,70			28036,19			
S15mut5	mut2	1	10354,67	9424,06	2537,41	186347,85	90810,67	27151,68	0,001
			13259,79			105740,46			
			13483,14			145634,45			
			6289,66			91522,43			
		2	7823,58			70479,39			
			7644,25			57515,60			
			7484,72			93961,47			
			9052,64			70820,87			
Seq15mutD	mut3	1	1568,69	4287,33	2979,75	11852,64	10852,47	3438,38	0,047
			1881,08			5942,22			
		2	4704,74			10111,72			
			8994,82			15503,28			
Seq15mut3	mut4	1	1713,84	2415,27	790,27	27056,92	19760,41	5337,40	0,001
BA M. Wehrs			1742,13			22257,20			
		2	3654,03			16669,84			
			2551,09			13057,67			

Tabelle 7: Normalisierte GUS-Werte der Transformation des CRM-DJ1E und mut1 bis 4 induziert mit SA (pmol 4-MU·min⁻¹·mg⁻¹, Werte zu Abbildung 10); Werte aus Kanofsky (2014)

Labor	Konstrukt	Experiment	- SA	Mittelwert	Std. abw.	+ SA	Mittelwert	Std. abw.	Signifikanz
	pBT10	1	1840,08	1602,00	238,08	2681,92	2053,73	628,19	0,054
		2	1363,92			1425,54			
	4D	1	5177,11	6490,73	1313,62	12032,53	15331,56	3299,03	0,000
		2	7804,35			18630,59			
Sequenz 15	4CRM-DJ1E	1	5718,48	6072,14	327,16	14044,52	15572,70	3966,16	0,006
			6255,29			9902,54			
		2	5800,34			18047,71			
			6514,45			20296,05			
Seq15mut4	mut1	1	9033,07	7470,34	1901,30	13427,09	9741,55	2380,50	0,244
			9645,88			10116,30			
		2	5215,59			7119,61			
			5986,83			8303,18			
Seq15mut5	mut2	1	5017,38	5585,41	659,79	14821,35	13292,53	3993,62	0,016
			6674,71			18927,97			
		2	5105,46			8289,65			
			5544,07			11131,13			
Seq15mutd	mut3	1	3129,86	3989,05	640,75	6391,51	9041,29	2522,22	0,015
			4242,99			7766,84			
		2	3718,79			13136,60			
			4864,57			8870,19			
Seq15mut3	mut4	1	2733,35	2787,39	481,04	9664,33	8392,90	1732,84	0,002
			2459,87			5805,77			
		2	2368,81			10241,48			
			3587,53			7860,01			

Tabelle 8: Normalisierte GUS-Werte der Kotransformation des CRM-DJ1E / mut 4 und ORA59 (pmol 4-MU·min⁻¹·mg⁻¹, Werte zu Abbildung 14)

Labor	Konstrukt	Experiment	+pORE	Mittelwert	Std. abw.	+ORA59	Mittelwert	Std. abw.	Signifikanz
	pBT10	1	1405,87	1355,73	181,48	3483,87	5096,74	1187,95	0,000
			1220,45			3181,35			
			1049,84			6447,24			
			1214,37			5887,05			
			1304,42			6204,85			
		2	1538,25			5053,47			
			1636,01			6061,04			
			1476,62			4455,07			
S15	4CRM-DJ1E	1	4405,49	4990,99	946,05	25874,48	31766,35	5237,09	0,000
			4043,02			25413,39			
			5951,79			26203,99			
			4152,12			31441,01			
		2	6058,87			38914,45			
			4271,49			37445,88			
			6539,59			37236,04			
			4505,54			31601,59			
S15mut3	mut4	1	2061,85	3300,38	1204,08	2968,36	3544,19	766,25	0,658
			2636,19			3303,01			
			2368,63			2959,44			
			2677,73			2303,18			
			3658,90			4773,62			
		2	5877,37			3819,75			
			4416,20			4421,77			
			2706,20			3804,38			

Tabelle 9: Normalisierte GUS-Werte der Kotransformation des CRM-DJ1E und ERF10 induziert mit Pep25 (pmol 4-MU·min⁻¹·mg⁻¹, Werte zu Abbildung 15)

Labor	Konstrukt	Experiment	-Pep25	Mittelwert	Std. abw.	+Pep25	Mittelwert	Std. abw.	Signifikanz	
	pBT10	1	1205,64	1238,76	33,11	1040,73	808,88	231,85	0,208	} 0,004
		2	1271,87			577,03				
	4D	1	4679,55	4844,59	165,05	65062,85	59584,66	5478,19	0,010	
		2	5009,64			54106,47				
	pBT10	1	886,33	1071,76	185,43	886,33	1071,76	185,43	1,000	
	+pORE	2	1257,20			1257,20				
	pBT10	1	2503,84	2754,94	251,10	1444,53	1587,96	143,43	0,056	
	+ERF10	2	3006,04			1731,39				
S15+pORE	4CRM-DJ1E	1	3810,05	5018,54	1357,52	30009,60	36977,08	8478,20	0,001	
	+pORE		4154,66			51484,72				
		2	4826,45			33013,58				
			7283,01			33400,41				
S15+ERF10	4CRM-DJ1E	1	4154,86	4285,51	295,04	11118,52	14010,85	2048,78	0,000	
	+ERF10		4079,07			13839,02				
		2	4113,70			16903,14				
			4794,41			14182,73				

Tabelle 10: Normalisierte GUS-Werte der Kotransformation des CRM-DJ1E mut5 bis 12 und ORA59 (pmol 4-MU·min⁻¹·mg⁻¹, Werte zu Abbildung 16; Werte aus Ahrendt, 2014)

Labor	Konstrukt	Experiment	+pORE	Mittelwert	Std. abw.	+ORA59	Mittelwert	Std. abw.	Signifikanz
	pBT10	1-8		1606,10	785,37		4449,60	1597,90	0,000
S15	4CRM-DJ1E	1-8		5088,38	1744,33		26799,73	5226,36	0,000
S15mut6	mut5	1	4.385,63	4107,10	596,58	11.699,94	12905,73	2228,21	0,000
			3.857,17			13.724,27			
			4.124,44			14.255,13			
			5.151,89			12.217,27			
		2	4.401,89			10.295,43			
			2.900,72			11.400,18			
			4.186,39			11.757,67			
			3.848,67			17.895,93			
S15mut7_2	mut6	1	3.335,60	4171,66	2228,21	21.149,97	20687,85	1140,76	0,000
			5.381,93			21.659,61			
			3.807,85			19.705,14			
			4.242,39			19.656,43			
		2	4.027,61			18.612,08			
			4.844,28			20.960,56			
			3.491,14			21.879,49			
			4.242,46			21.879,49			
S15mut8	mut7	1	10.777,06	9166,52	1561,83	59.533,16	45949,72	9808,22	0,000
			6.153,35			47.689,19			
			8.730,92			35.602,41			
			-			57.183,50			
		2	10.522,63			36.782,08			
			10.253,86			52.419,98			
			9.027,68			31.081,62			
			8.838,95			47.305,83			
S15mut9	mut8	1	1.955,88	3661,88	1249,30	4.446,66	4645,718	1040,82	0,132
			3.410,23			5.048,88			
			3.245,06			4.096,24			
			2.358,58			4.762,79			
		2	5.167,67			3.049,64			
			5.871,21			4.272,17			
			3.147,88			4.510,55			
			4.138,54			6.978,83			
S15mut10	mut9	1	2.641,82	1998,30	516,38	2.375,68	2475,753	347,04	0,062
			2.176,90			3.177,68			
			2.359,94			2.052,50			
			2.735,16			2.133,54			
		2	1.607,30			2.588,81			
			1.713,71			2.190,93			
			1.328,34			2.728,17			
			1.423,24			2.558,71			
S15mut11	mut10	1	3.698,25	2623,40	826,47	2.533,76	2386,405	531,22	0,534
			3.463,60			2.495,81			
			3.389,54			2.906,19			
			3.134,40			3.144,71			
		2	2.088,35			2.682,26			
			1.460,39			2.085,31			
			1.882,19			1.745,26			
			1.870,52			1.497,94			
S15mut13_2	mut11	1	6.472,83	5336,79	910,44	32.334,14	21896,27	7599,82	0,000
			5.173,54			30.617,79			
			7.045,97			22.107,46			
			4.687,35			29.605,33			
		2	4.744,23			10.525,74			
			5.441,43			18.663,56			
			4.108,46			15.642,42			
			5.020,53			15.673,71			
S15mut14_2	mut12	1	6.262,78	5860,05	709,07	16.748,40	13522,42	3914,86	0,000
			5.788,48			19.502,42			
			6.078,00			15.816,74			
			5.447,51			15.654,84			
		2	5.268,99			8.122,15			
			7.416,93			13.577,99			
			4.950,82			8.129,66			
			5.666,87			10.627,15			

Tabelle 11: Normalisierte GUS-Werte der nativen Promotoranalyse des At1g13990-Gens (pmol 4-MU·min⁻¹·mg⁻¹, Werte zu Abbildung 19; Teilergebnisse aus Roling, 2015)

Labor	Konstrukt	Experiment	- Pep25	Mittelwert	Std. abw.	+ Pep25	Mittelwert	Std. abw.	Signifikanz
teilweise BA L. Roling	pBT10	1-9		2388,98	874,33		2776,05	884,92	0,208
teilweise BA L. Roling	4D	1-9		12711,10	3353,63		131775,81	67773,76	0,000
85bp-Prom	85::uidA	1	1679,43	1249,74	414,95	2385,47	1574,31	516,06	0,071
teilweise			1690,89			2199,68			
BA L. Roling			1562,96			2180,99			
			2059,07			2198,86			
		2	1188,83			1333,04			
			1180,96			1684,28			
			868,40			1568,24			
			748,06			1274,99			
		3	858,83			1375,18			
			738,34			820,65			
			940,34			1320,16			
			731,28			-			
		4	1989,55			1448,42			
			1537,81			676,06			
			1022,48			984,15			
			1297,79			1416,23			
120bp-Prom	120::uidA	1	2638,54	2557,19	559,59	3399,71	5490,22	1975,13	0,000
teilweise			2790,91			4866,43			
BA L. Roling		2	1995,23			4940,91			
			4050,55			9235,97			
		3	2528,77			5261,91			
			2029,24			3534,11			
			2270,73			3906,20			
			2670,06			3749,77			
		4	3111,30			9392,20			
			2281,39			5912,98			
			2444,46			6439,82			
			2430,15			6652,48			
		5	1518,49			3537,31			
			3031,20			7810,02			
		6	2566,82			3713,55			
155bp-Prom	155::uidA	1	3237,20	2010,86	460,40	6188,48	5308,37	2306,92	0,000
teilweise			2654,64			6646,74			
BA L. Roling		2	2067,96			10088,87			
			2202,97			10994,50			
			1963,99			6967,83			
			2181,54			6475,58			
		3	1658,03			3070,17			
			1538,85			3385,16			
			1603,05			2902,75			
		4	2192,04			4302,00			
			1579,78			2732,48			
			1725,71			3292,69			
			2367,98			6265,00			
		5	1494,89			6203,41			
			2042,86			2983,55			
			1822,01			4639,05			
		6	1403,39			-			
			2774,83			4751,54			
			1815,48			3105,08			
		7	1889,92			5864,05			
412bp-Prom	412::uidA	1	4884,55	3948,05	737,58	10829,21	7450,27	2020,06	0,000
			3645,50			5591,45			
		2	4498,69			10989,11			
			3477,68			7520,27			
			4134,95			6709,64			
			3708,27			7423,49			
		3	4728,97			5347,66			
			2605,06			-			
		4	4246,06			7270,39			
			4112,80			5371,21			
Signifikanzen zueinander									
120/155	0.815	84/120	0.000	120/412	0.036	84/155	0.000	155/412	0.030

Tabelle 12: Normalisierte GUS-Werte der Transformation des Mono-, Di- und Tetramers der MRS (pmol 4-MU-min⁻¹·mg⁻¹, Werte zu Abbildung 20; Gonzales, 2015)

Labor	Konstrukt	Experiment	- Pep25	Mittelwert	Std. abw.	+ Pep25	Mittelwert	Std. abw.	Signifikanz
	pBT10	1-8	-	2066,07	720,84	-	2424,07	1191,14	0,405
	4D	1-8	-	28539,03	19737,01	-	155792,08	56086,52	0,000
1xSeq2	1MRS:: <i>uid A</i>	1	21641,99	11194,53	4981,30	30539,50	24475,13	7070,80	0,000
			-			31321,48			
			13726,97			29520,23			
		2	10604,80			35486,27			
			18469,98			22511,77			
		3	7977,67			-			
			7781,30			18050,22			
		4	20401,93			31172,28			
			17781,91			28791,00			
		5	8036,54			14338,16			
			10995,83			18823,88			
		6	8816,26			17416,99			
			9741,19			15729,75			
2xSeq2	2MRS:: <i>uid A</i>	1	22284,57	28941,09	10498,11	81795,11	75768,87	23695,98	0,000
			42250,77			109890,85			
			22623,05			67796,52			
		2	18361,26			71155,47			
			34060,59			76342,82			
			-			112388,08			
		3	14682,64			42611,97			
			14004,98			42902,97			
		4	35831,82			92898,44			
			43565,12			93250,45			
		5	23073,10			47016,90			
			29462,11			63661,28			
		6	46562,02			52562,39			
			29472,11			106490,96			
4xSeq2	4MRS:: <i>uid A</i>	1	75802,86	54205,20	23611,45	168406,90	119689,52	33170,47	0,000
			68956,67			175171,15			
		2	92851,02			182636,58			
			48650,13			90495,30			
		3	37062,53			86867,91			
			89976,66			237101,00			
		4	81379,04			135864,72			
			46258,77			118342,84			
		5	44751,14			108703,41			
			58771,95			93673,02			
		6	47531,39			90743,36			
			19775,30			105489,67			
		7	22502,22			93987,39			
			24603,11			105581,51			

Tabelle 13: Normalisierte GUS-Werte der Transformation der MRS-At1g13990 und mut1 bis 3 induziert mit Pep25 (pmol 4-MU·min⁻¹·mg⁻¹, Werte zu Abbildung 21; Wehrs, 2012)

Labor	Konstrukt	Experiment	- Pep25	Mittelwert	Std. abw.	+ Pep25	Mittelwert	Std. abw.	Signifikanz
	pBT10	1	866,02	907,48	74,07	904,44	1.341,73	402,95	0,116
			968,68			1.224,93			
		2	987,87			2.000,29			
			807,37			1.237,24			
	4D	1	7.447,18	4273,64	1868,06	67.613,13	105.113,72	37.755,42	0,004
			3.549,35			83.230,70			
		2	3.475,20			166.848,62			
			2.622,83			102.762,43			
Sequenz 2	MRS At1g13990	1	51.580,86	36151,09	10871,17	111.940,43	155.735,31	10.771,04	0,023
			23.718,48			150.113,75			
		2	28.504,73			120693,185			
			40.800,28			240193,892			
Seq2mut1	mut1	1	583,26	678,15	120,43	664,32	851,71	345,31	0,443
			570,23			412,59			
		2	687,92			1.002,57			
			871,20			1.327,38			
Seq2mut2	mut2	1	366,47	602,51	151,19	543,92	1.266,13	692,89	0,156
			599,60			605,65			
		2	662,14			1.899,83			
			781,81			2.015,12			
Seq2mut3	mut3	1	19.598,61	35739,67	19367,25	88.110,79	93.964,64	19.097,91	0,010
			40.471,26			96.985,88			
		2	17.440,75			68.814,85			
			65.448,07			121.947,02			

Tabelle 14: Normalisierte GUS-Werte der Transformation der MRS-At1g13990 und mut4 bis 15 induziert mit Pep25 (pmol 4-MU·min⁻¹·mg⁻¹, Werte zu Abbildung 22)

Labor	Konstrukt	Experiment	- Pep25	Mittelwert	Std. abw.	+ Pep25	Mittelwert	Std. abw.	Signifikanz
	pBT10	1-15		1779,53	535,30		2157,91	1024,37	
	4D	1-15		20573,03	15517,54		161879,45	63166,68	
S2	MRS	1-15		33216,03	15455,57		146588,21	49671,49	
S2mut4	mut7	1	20703,89	13724,93	6646,49	46757,54	35563,85	12565,83	0,037
			20016,48			49417,40			
		2	7514,48			22448,88			
			6664,87			23631,59			
S2mut5	mut8	1	11032,10	10673,01	2773,55	18620,60	16920,25	2706,88	0,085
		2	13876,08			19040,33			
			7110,84			13099,81			
S2Mut6	mut9	1	9627,17	9370,44	5182,70	20549,04	25346,60	11952,68	0,078
			17727,78			45877,34			
		2	5526,77			16220,71			
			4600,05			18739,31			
S2Mut7	mut10	1	17713,00	21440,35	6551,72	122014,02	110637,37	29124,09	0,002
			31304,54			134269,58			
		2	13807,16			60790,01			
			22936,70			125475,86			
S2Mut8	mut11	1	-	1706,48	814,45	2032,85	3036,38	1597,04	0,085
			1108,13			2006,49			
		2	2348,08			2444,88			
			1087,60			5286,27			
		3	2336,96			-			
			1651,61			3411,41			
S2Mut9	mut12	1	21246,32	21103,82	5522,30	103250,89	94560,12	45305,97	0,032
			30004,37			164561,13			
		2	15619,33			46887,91			
			17545,25			63540,55			
S2Mut10	mut13	1	34813,22	48729,67	16126,23	160093,80	187528,09	59785,93	0,008
			34008,68			109472,97			
		2	52565,21			209546,78			
			73531,59			270998,82			
S2Mut13	mut4	1	22124,71	24679,70	8749,26	58737,39	68511,64	17410,81	0,001
			16224,12			53940,41			
		2	22124,71			58737,39			
			16224,12			53940,41			
		3	30177,45			95832,15			
			41203,08			89882,06			
S2Mut12	mut5	1	16822,69	21093,34	5455,00	60005,46	87122,68	18819,39	0,000
			25320,86			80774,29			
		2	20596,31			127209,71			
			14641,05			80166,14			
		3	14669,19			88553,53			
			31819,94			103084,32			
			22682,24			78749,94			
			22194,41			78438,01			
S2Mut11	mut6	1	46187,78	48738,36	11303,86	120144,83	157920,56	45360,98	0,000
			26749,03			87647,96			
		2	50570,25			199010,72			
			66259,41			220103,21			
			50552,98			159377,54			
		3	48955,68			140643,44			
			60648,40			213095,50			
			39983,39			123341,30			
S2mut14	mut14	1	18927,15	17701,07	967,34	39674,88	47650,86	13819,45	0,010
BA L. Roling			16931,51			42569,41			
		2	18351,24			71343,83			
			16594,37			37015,33			
S2mut15	mut15	1	3862,93	4767,01	1869,66	2425,22	2783,41	1258,96	0,076
BA L. Roling			3260,98			-			
			8797,54			4234,43			
		2	4623,26			2225,15			
			3512,84			2088,71			
			4544,50			2943,56			

Tabelle 15: Normalisierte GUS-Werte der Transformation der Kombinationsanalyse (pmol 4-MU·min⁻¹·mg⁻¹, Werte zu Abbildung 25)

Labor	Konstrukt	Experiment	- Pep25	Mittelwert	Std. abw.	+ Pep25	Mittelwert	Std. abw.	Signifikanz
	pBT10	1	3025,74	3527,26	896,90	2389,24	3431,24	823,12	0,896
			2352,82			2888,04			
		2	4667,28			4414,72			
			4063,20			4032,95			
	4D	1	16208,19	37800,23	17181,54	60243,45	110284,91	47388,32	0,035
			58247,47			65983,86			
		2	1513,82			163184,50			
			38945,04			151727,82			
4xS2	4S2	1-3		34800,78	13545,48		127492,79	26819,04	0,000
4xS15	4S15	1-3		19200,38	2964,01		143110,02	123,32	0,000
2-15-2-15	2-15-2-15	1	58204,78	68977,46	60536,68	105606,07	148770,88	30517,13	0,005
			66686,72			136748,10			
		2	86261,44			186228,70			
			64756,90			166500,63			
15-2-15-2	15-2-15-2	1	68036,46	87182,15	17785,93	154299,08	174615,42	35836,26	0,009
			71077,59			130857,22			
		2	101794,58			226103,19			
			107819,97			187202,17			
15-15-2-2	15-15-2-2	1	101541,73	73825,67	17529,51	162873,96	148555,74	12177,77	0,001
			67061,48			139422,58			
		2	53457,57			133894,15			
			73241,92			158032,26			
2-2-15-15	2-2-15-15	1	44054,66	48643,91	65460,22	133853,90	139408,66	7399,98	0,000
			40392,00			135449,01			
		2	62134,27			152142,17			
			47994,71			136189,56			

8 Materiallisten

8.1 Glycerinkulturen und DNA-Konstrukte

Tabelle 16: Laborinterne Nummern der *E. coli* Glycerinkulturen und zugehörige DNA-Konstrukte

Glyc. Nr.	DNA Nr.	Name (Labor)	Merkmale
4469	6889	2xS1 pHis2.1	Dimer der Sequenz 1 aus GUS-Vektor in pHis2.1 mittels <i>EcoRI</i> und <i>SacI</i> , LB Medium Kan ^r , <i>E. coli</i> XL1blue
4420	-	4xS1 pHis2.1	Tetramer der Sequenz 1 kloniert in pHis2.1 mit <i>EcoRI</i> und <i>SacI</i> , amplifiziert aus pBT10GUS_d35SLUC, In <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium Kan ^r
4468	7100	2xS2 pHis2.1	Dimer der Sequenz 2 aus GUS-Vektor in pHis2.1 mittels <i>EcoRI</i> und <i>SacI</i> , LB Medium Kan ^r , <i>E. coli</i> XL1blue
4421	-	4xS2 pHis2.1	Tetramer der Sequenz 2 kloniert in pHis2.1 mit <i>EcoRI</i> und <i>SacI</i> , amplifiziert aus pBT10GUS_d35SLUC, In <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium Kan ^r
4808	7300	4xS2mut7 pHis2.1	Tetramer der Sequenz 2 mut7 in pHis2.1 mittels <i>SacI</i> und <i>EcoRI</i> ; LB Medium Kan ^r , <i>E. coli</i> XL1 Blue
4809	7301	4xS2mut9 pHis2.1	Tetramer der Sequenz 2 mut9 in pHis2.1 mittels <i>SacI</i> und <i>EcoRI</i> ; LB Medium Kan ^r , <i>E. coli</i> XL1blue
4857	7302	4xS2mut14 pHis2.1	Tetramer der Sequenz 2 mut14 in pHis2.1 mittels <i>SacI</i> und <i>EcoRI</i> ; LB Medium Kan ^r , <i>E. coli</i> XL1blue

4858	7394	4xS2mut15 pHis2.1	Tetramer der Sequenz 2 mut14 in pHis2.1 mittels <i>SacI</i> und <i>EcoRI</i> ; LB Medium Kan ^r , <i>E. coli</i> XL1B
4422	-	4xS15 pHis2.1	Tetramer der Sequenz 15 kloniert in pHis2.1 mit <i>EcoRI</i> und <i>SacI</i> , amplifiziert aus pBT10GUS_d35SLUC, In <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium Kan ^r
4530	-	4xS15mut1 pHis2.1	Tetramer der Mutation 1 der Sequenz 15 kloniert in der Y1H-Vektor pHis2.1 mittels <i>SacI</i> und <i>EcoRI</i> , <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium Kan ^r
4531	-	4xS15mut3 pHis2.1	Tetramer der Sequenz 15 der Mutation 3 kloniert in der Y1H-Vektor pHis2.1 mittels <i>SacI</i> und <i>EcoRI</i> , <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium Kan ^r
4861	7101	4xS15.1 pHis2.1	Tetramer der Sequenz 15.1 kloniert in der Y1H-Vektor pHis2.1 mittels <i>SacI</i> und <i>EcoRI</i> , <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium Kan ^r
4470	6891	2x21G-2_M1_S1 pHis2.1	Dimer der Sequenz 21G-2_M1_S1 aus GUS-Vector in pHis2.1 mittels <i>EcoRI</i> und <i>SacI</i> , LB Medium Kan ^r , <i>E. coli</i> XL1 Blue
4525		4x21G-2_M1_S2 pHis2.1	Tetramer der Sequenz 21G-2_M1_S2 kloniert in pHis2.1 mit <i>EcoRI</i> und <i>SacI</i> , amplifiziert aus pBT10GUS_d35SLUC, In <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium Kan ^r
4471	6910	4x22DDD_M1_S1 pHis2.1	Tetramer der Sequenz 22DDD_M1_S1 kloniert in pHis2.1 mit <i>EcoRI</i> und <i>SacI</i> , amplifiziert aus pBT10GUS_d35SLUC, In <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium Kan ^r
4555	7019	1xS2mutA pBT10GUS_d35SLUC	Monomer der Sequenz 2 mutA in pBT10GUS_d35SLUC, <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium carb ^r

4556	7020	2xS2mutA pBT10GUS_d35SLUC	Dimer der Sequenz 2 mutA in pBT10GUS_d35SLUC, <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium carb ^r
4529	7021	4xS2mutA pBT10GUS_d35SLUC	Tetramer der Sequenz 2mutA in pBT10GUS_d35SLUC, <i>E. coli</i> XL1 Blue, carb ^r
4557	7022	1xS2mutB pBT10GUS_d35SLUC	Monomer der Sequenz 2mutB in pBT10GUS_d35SLUC, <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium carb ^r
4558	7023	2xS2mutB pBT10GUS_d35SLUC	Dimer der Sequenz 2 mutB in pBT10GUS_d35SLUC, <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium carb ^r
4559	7024	4xS2mutB pBT10GUS_d35SLUC	Tetramer der Sequenz 2 mutB in pBT10GUS_d35SLUC, <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium carb ^r
4560	7025	1xS2mutC pBT10GUS_d35SLUC	Monomer der Sequenz 2 mutC in pBT10GUS_d35SLUC, <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium carb ^r
4561	7026	2xS2mutC pBT10GUS_d35SLUC	Dimer der Sequenz 2 mutC in pBT10GUS_d35SLUC, <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium carb ^r
4562	7027	4xS2mutC pBT10GUS_d35SLUC	Tetramer der Sequenz 2 mutC in pBT10GUS_d35SLUC, <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium carb ^r
4563	7028	1xS2mutD pBT10GUS_d35SLUC	Monomer der Sequenz 2 mutD in pBT10GUS_d35SLUC, <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium carb ^r
4564	7029	2xS2mutD pBT10GUS_d35SLUC	Dimer der Sequenz 2 mutD in pBT10GUS_d35SLUC, <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium carb ^r

4565	7030	4xS2mutD pBT10GUS_d35SLUC	Tetramer der Sequenz 2 mutD in pBT10GUS_d35SLUC, <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium carb ^r
4566	7031	1xS2mutE pBT10GUS_d35SLUC	Monomer der Sequenz 2 mutE in pBT10GUS_d35SLUC, <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium carb ^r
4567	7032	2xS2mutE pBT10GUS_d35SLUC	Dimer der Sequenz 2 mutE in pBT10GUS_d35SLUC, <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium carb ^r
4568	7033	4xS2mutE pBT10GUS_d35SLUC	Tetramer der Sequenz 2 mutE in pBT10GUS_d35SLUC, <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium carb ^r
4784	7311	1xS2mut11 pBT10GUS_d35SLUC	Monomer der Sequenz 2 mut11 in pBT10GUS/LUC. Kloniert mit <i>SpeI</i> und <i>XbaI</i> . LB Medium carb ^r , <i>E. coli</i> XL1 Blue
4787	7314	2xS2mut11 pBT10GUS_d35SLUC	Dimer der Sequenz 2 mut11 in pBT10GUS/LUC. Kloniert mit <i>SpeI</i> und <i>XbaI</i> . LB Medium carb ^r , <i>E. coli</i> XL1 Blue
4790	7317	4xS2mut11 pBT10GUS_d35SLUC	Tetramer von Sequenz 2 mut11 in pBT10GUS/LUC. Kloniert mit <i>SpeI</i> und <i>XbaI</i> . LB Medium carb ^r , <i>E. coli</i> XL1 Blue
4785	7312	1xS2mut12 pBT10GUS_d35SLUC	Monomer der Sequenz 2 mut12 in pBT10GUS/LUC. Kloniert mit <i>SpeI</i> und <i>XbaI</i> . LB Medium carb ^r , <i>E. coli</i> XL1 Blue
4788	7315	2xS2mut12 pBT10GUS_d35SLUC	Dimer der Sequenz 2 mut12 in pBT10GUS/LUC. Kloniert mit <i>SpeI</i> und <i>XbaI</i> . LB Medium carb ^r , <i>E. coli</i> XL1 Blue
4791	7318	4xS2mut12 pBT10GUS_d35SLUC	Tetramer von Sequenz 2 mut12 in pBT10GUS/LUC. Kloniert mit <i>SpeI</i> und <i>XbaI</i> . LB Medium carb ^r , <i>E. coli</i> XL1 Blue

4786	7313	1xS2mut13 pBT10GUS_d35SLUC	Monomer der Sequenz 2 mut13 in pBT10GUS/LUC. Kloniert mit <i>SpeI</i> und <i>XbaI</i> . LB Medium carb ^r , <i>E. coli</i> XL1 Blue
4789	7316	2xS2mut13 pBT10GUS_d35SLUC	Dimer der Sequenz 2 mut13 in pBT10GUS/LUC. Kloniert mit <i>SpeI</i> und <i>XbaI</i> . LB Medium carb ^r , <i>E. coli</i> XL1 Blue
4792	7319	4xS2mut13 pBT10GUS_d35SLUC	Tetramer der Sequenz 2 mut13 in pBT10GUS/LUC. Kloniert mit <i>SpeI</i> und <i>XbaI</i> . LB Medium carb ^r , <i>E. coli</i> XL1 Blue
4636	7090	4xS2.1 pBT10GUS_d35SLUC	Tetramer Sequenz 2.1 in pBT10GUS_d35SLUC, <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium carb ^r
4543	7007	1xS15mutA pBT10GUS_d35SLUC	Monomer der Sequenz 15 mutA in pBT10GUS_d35SLUC, <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium carb ^r
4544	7008	2xS15mutA pBT10GUS_d35SLUC	Dimer der Sequenz 15 mutA in pBT10GUS_d35SLUC, <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium carb ^r
4545	7009	4xS15mutA pBT10GUS_d35SLUC	Tetramer der Sequenz 15 mutA in pBT10GUS_d35SLUC <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium carb ^r
4546	7010	1xS15mutB pBT10GUS_d35SLUC	Monomer der Sequenz 15 mutB in pBT10GUS_d35SLUC, <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium carb ^r
4547	7011	2xS15mutB pBT10GUS_d35SLUC	Dimer der Sequenz 15 mutB in pBT10GUS_d35SLUC <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium carb ^r
4548	7012	4xS15mutB pBT10GUS_d35SLUC	Tetramer der Sequenz 15 mutB in pBT10GUS_d35SLUC, <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium carb ^r

4549	7013	1xS15mutC pBT10GUS_d35SLUC	Monomer der Sequenz 15 mutC in pBT10GUS_d35SLUC <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium carb ^r
4550	7014	2xS15mutC pBT10GUS_d35SLUC	Dimer der Sequenz 15 mutC in pBT10GUS_d35SLUC, <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium carb ^r
4551	7015	4xS15mutC pBT10GUS_d35SLUC	Tetramer der Sequenz 15 mutC in pBT10GUS_d35SLUC, <i>E. coli</i> XL1-Blue, LB Medium carb ^r
4552	7016	1xS15mutD pBT10GUS_d35SLUC	Monomer der Sequenz 15 mutD in pBT10GUS_d35SLUC, <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium carb ^r
4553	7017	2xS15mutD pBT10GUS_d35SLUC	Dimer der Sequenz 15 mutD in pBT10GUS_d35SLUC, <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium carb ^r
4554	7018	4xS15mutD pBT10GUS_d35SLUC	Tetramer der Sequenz 15 mutD in pBT10GUS_d35SLUC, <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium carb ^r
4569	7042	1xS15mutE pBT10GUS_d35SLUC	Monomer der Sequenz 15 mutE in pBT10GUS_d35SLUC, <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium carb ^r
4570	7043	2xS15mutE pBT10GUS_d35SLUC	Dimer der Sequenz 15 mutE in pBT10GUS_d35SLUC, <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium carb ^r
4571	7044	4xS15mutE pBT10GUS_d35SLUC	Tetramer der Sequenz 15 mutA in pBT10GUS_d35SLUC, <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium carb ^r
4572	7045	1xS15mutF pBT10GUS_d35SLUC	Monomer der Sequenz 15 mutF in pBT10GUS_d35SLUC, <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium carb ^r

4573	7046	2xS15mutF pBT10GUS_d35SLUC	Dimer der Sequenz 15 mutF in pBT10GUS_d35SLUC, <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium carb ^r
4574	7047	4xS15mutF pBT10GUS_d35SLUC	Tetramer der Sequenz 15 mutF in pBT10GUS_d35SLUC, <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium carb ^r
4575	7048	1xS15mutG pBT10GUS_d35SLUC	Monomer der Sequenz 15 mutG in pBT10GUS_d35SLUC, <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium carb ^r
4576	7049	2xS15mutG pBT10GUS_d35SLUC	Dimer der Sequenz 15 mutG in pBT10GUS_d35SLUC, <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium carb ^r
4577	7050	4xS15mutG pBT10GUS_d35SLUC	Tetramer der Sequenz 15 mutG in pBT10GUS_d35SLUC, <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium carb ^r
4698	7116	1xS15mut4 pBT10GUS_d35SLUC	Monomer der Sequenz 15 mut4 in pBT10GUS/LUC-Vektor. Kloniert mit <i>SpeI</i> und <i>XbaI</i> . LB Medium carb ^r , <i>E. coli</i> XL1 Blue
4708	7141	2xS15mut4 pBT10GUS_d35SLUC	Dimer der Sequenz 15 mut4 in pBT10GUS/LUC-Vektor. Kloniert mit <i>SpeI</i> und <i>XbaI</i> . LB Medium carb ^r , <i>E. coli</i> XL1 Blue
4715	7148	4xS15mut4 pBT10GUS_d35SLUC	Tetramer der Sequenz 15 mut4 in pBT10GUS/LUC-Vektor. Kloniert mit <i>SpeI</i> und <i>XbaI</i> . LB Medium carb ^r , <i>E. coli</i> XL1 Blue
4699	7117	1xS15mut5 pBT10GUS_d35SLUC	Monomer der Sequenz 15 mut5 in pBT10GUS/LUC-Vektor. Kloniert mit <i>SpeI</i> und <i>XbaI</i> . LB Medium carb ^r , <i>E. coli</i> XL 1 Blue
4709	7142	2xS15mut5 pBT10GUS_d35SLUC	Dimer der Sequenz 15 mut5 in pBT10GUS/LUC-Vektor. Kloniert mit <i>SpeI</i> und <i>XbaI</i> . LB Medium carb ^r , <i>E. coli</i> XL1 Blue

4716	7149	4xS15mut5 pBT10GUS_d35SLUC	Tetramer der Sequenz 15 mut5 in pBT10GUS/LUC-Vektor. Kloniert mit <i>SpeI</i> und <i>XbaI</i> . LB Medium carb ^r , <i>E. coli</i> XL1 Blue
4730	7157	1xS15mut12 pBT10GUS_d35SLUC	Monomer der Sequenz 15 mut12 in pBT10GUS/LUC-Vektor. Kloniert mit <i>SpeI</i> und <i>XbaI</i> . LB Medium carb ^r , <i>E. coli</i> XL1 Blue
4751	7161	2xS15mut12 pBT10GUS_d35SLUC	Dimer der Sequenz 15 mut12 in pBT10GUS/LUC-Vektor. Kloniert mit <i>SpeI</i> und <i>XbaI</i> . LB Medium carb ^r , <i>E. coli</i> XL1 Blue
4733	7160	4xS15mut12 pBT10GUS_d35SLUC	Tetramer der S15mut12 in pBT10GUS/LUC- Vektor. Kloniert mit <i>SpeI</i> und <i>XbaI</i> . LB Medium carb ^r , <i>E. coli</i> XL1 Blue
4578	7051	1xS15.1 pBT10GUS_d35SLUC	Monomer der S15.1 (verkürzte Seq.15) in pBT10GUS_d35SLUC, <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium carb ^r
4579	7052	2xS15.1 pBT10GUS_d35SLUC	Dimer der Sequenz 15.1 in pBT10GUS_d35SLUC, <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium carb ^r
4580	7053	4xS15.1 pBT10GUS_d35SLUC	Tetramer der Sequenz 15.1 in pBT10GUS_d35SLUC, <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium carb ^r
4581	7054/7208	1xS15 pBT10GUS_d35SLUC	Monomer der Sequenz 15 in pBT10GUS_d35SLUC, <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium carb ^r
4582	7055	2xS15 pBT10GUS_d35SLUC	Dimer der Sequenz 15 in pBT10GUS_d35SLUC, <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium carb ^r
4820	7305	S2- S15 -> GUS pBT10GUS_d35SLUC	Dimer des Kombinationselementes von Sequenz 2 und Sequenz 15. Reihenfolge: Seq 2 - Seq 15 -> GUS. Kloniert in pBT10GUS- d35SLUC mit <i>SpeI</i> und <i>XbaI</i> . LB Medium carb ^r , <i>E. coli</i> XL-1-Blue

4821	7306	S15- S2 -> GUS pBT10GUS_d35SLUC	Dimer des Kombinationselementes von Sequenz 15 und Sequenz 2. Reihenfolge: Seq 15 - Seq 2 -> GUS. Kloniert in pBT10GUS-d35SLUC mit <i>SpeI</i> und <i>XbaI</i> . LB Medium carb ^r , <i>E. coli</i> XL-1-Blue
4822	7307	S2- S15- S2- S15 -> GUS pBT10GUS_d35SLUC	Tetramer des Kombinationselementes von Sequenz 2 und Sequenz 15. Reihenfolge: Seq 2 - Seq 15 - Seq 2 - Seq 15 -> GUS. Kloniert in pBT10GUS-d35SLUC mit <i>SpeI</i> und <i>XbaI</i> . LB Medium carb ^r , <i>E. coli</i> XL-1-Blue
4823	7308	S15- S2 -S15- S2 -> GUS pBT10GUS_d35SLUC	Tetramer des Kombinationselementes von Sequenz 15 und Sequenz 2. Reihenfolge: Seq 15 - Seq 2 -Seq 15 -Seq 2 -> GUS. Kloniert in pBT10GUS-d35SLUC mit <i>SpeI</i> und <i>XbaI</i> . LB Medium carb ^r , <i>E. coli</i> XL-1-Blue
4824	7309	S15- S15- S2- S2 -> GUS pBT10GUS_d35SLUC	Tetramer des Kombinationselementes von Sequenz 15 und Sequenz 2. Reihenfolge: Seq 15 - Seq 15 -Seq 2 -Seq 2 -> GUS. Kloniert in pBT10GUS-d35SLUC mit <i>SpeI</i> und <i>XbaI</i> . LB Medium carb ^r , <i>E. coli</i> XL-1-Blue
4825	7310	S2- S2- S15- S15 -> GUS pBT10GUS_d35SLUC	Tetramer des Kombinationselementes von Sequenz 2 und Sequenz 15. Reihenfolge: Seq 2 - Seq 2 -Seq 15 -Seq 15 -> GUS. Kloniert in pBT10GUS-d35SLUC mit <i>SpeI</i> und <i>XbaI</i> . LB Medium carb ^r , <i>E. coli</i> XL-1-Blue
4667	7110	126bp::Prom- At2g38860 pBT10GUS- d35SLUC	126bp::Prom-At2g38860 126 bP des Promotors des Gens At2g38860 in dem Vektor pBT10GUS-2d35SLUC, <u>ohne</u> Minimalpromotor. Kloniert mit <i>XhoI</i> / <i>SpeI</i> . Die 126 bp enthalten die Seq.15 NICHT. In <i>E. coli</i> , LB Medium carb ^r
4806		164bp::Prom- At2g38860 pBT10GUSd35SLUC	164bp::Prom-At2g38860 164 bP des Promotors des Gens At2g38860 in dem Vektor pBT10GUS-d35SLUC, ohne Minimalpromotor. Kloniert mit <i>XhoI</i> / <i>SpeI</i> . Die 164 bp enthalten die Seq.15. In <i>E. coli</i> , LB Medium carb ^r

4668	7111	300bp::Prom- At2g38860 pBT10GUS- d35SLUC	300bp::Prom-At2g38860 126 bP des Promotors des Gens At2g38860 in dem Vektor pBT10GUS-2d35SLUC, ohne Minimalpromotor. Kloniert mit <i>XhoI/Spel</i> . Die 300 bp enthalten die Seq.15. In <i>E. coli</i> , LB Medium carb ^r
4807	7304	412bp::Prom- At1g13990 pBT10GUSd35SLUC	412bp::Prom-At1g13990 412 bP des Promotors des Gens At1g13990 in dem Vektor pBT10GUS-d35SLUC, ohne Minimalpromotor. Kloniert mit <i>XhoI/Spel</i> . Seq. beginnt hinter 3'UTR des Gens At1g13980/ enthält Seq.2 und enthält 5'UTR des davor liegenden Gens. In <i>E.</i> <i>coli</i> , LB Medium carb ^r
4697		4xD pBT10GUSd35SLUC	Positivkontrolle Petersilienprotoplastentransformation, <i>E. coli</i> , LB Medium carb ^r
4706	7124/7107	ORA59+pORE- O2_d35S_pA	Transkriptionsfaktor ORA59 kloniert in Expressionsvektor pORE mittels <i>XbaI</i> und <i>EcoRI</i> . In <i>E. coli</i> XL1 Blue, LB Medium Kan ^r
4524	7102	ERF10+pORE- O2_d35S_pA	ERF10-Gen in pORE-O2_d35S_pA, Kloniert aus Erf10+pCR2.1 mittels <i>XbaI</i> Und <i>EcoRI</i> ; LB Medium carb ^r
4492	7103	ERF10 pCR2.1	ERF10-Gen in pCR2.1,enthält <i>XbaI</i> und <i>EcoRI</i> - Schnittstellen durch PCR-Amplifikation; LB Medium carb ^r
	7104	ORA59 pCR2.1	ORA59-Gen in pCR2.1,enthält <i>XbaI</i> und <i>EcoRI</i> - Schnittstellen durch PCR-Amplifikation; LB Medium carb ^r
4522	-	pDEST_GAD424 +MYB96	MYB96-Gen in pDEST_GAD424-Vektor (aus TF-Only-Library), in MRF <i>E. coli</i> , LB Medium carb ^r
4523	7298	pDEST_GAD424 +ERF10	ERF10-Gen in pDEST_GAD424-Vektor (aus TF-Only-Library), in MRF <i>E. coli</i> , LB Medium carb ^r

4583	-	pDEST_GAD424 +Myb46	Myb46-Gen in pDEST_GAD424-Vektor (aus TF-Only-Library), in MRF <i>E. coli</i> , LB Medium carb ^r
4584	7297	pDEST_GAD424 +At4g18651	At4g1865-Gen in pDEST_GAD424-Vektor (aus TF-Only-Library), in MRF <i>E. coli</i> , LB Medium carb ^r
4585	7296	pDEST_GAD424+ORA 59	ORA59-Gen (At1g06160) in pDEST_GAD424-Vektor (aus TF-Only-Library), in MRF <i>E. coli</i> , LB Medium carb ^r
4017	-	pORE_O2_d35S_pA	pORE_O2_d35S_pA in <i>E. coli</i> , LB Medium Kan ^r
3804	-	pABAI	<i>E. coli</i> mit enthaltenem pABAI , <i>E. coli</i> , LB Medium Carb ^r
4419	-	pHis2.1	Yeast-one-hybrid pHis2.1 von CloneTech Vektor in <i>E. coli</i> XL1-blue; LB Medium Kan ^r
3431	-	pRT103-GUS	pRT103-GUS in <i>E. coli</i> , LB Medium carb ^r
4696	-	pBT10GUS_d35SLUC	aus Glycerol 4511, <i>E. coli</i> , LB Medium carb ^r
4755	-	pREP4	Vektor pREP4 in XL1-blue (Vektor bei Überexpression gegen Hintergrundexpression)

Tabelle 17: Laborinterne Nummern der *S. cerevisiae* Glycerinkulturen

Glyc. Nr.	Name	Merkmale
4467	2xS1 pHis2.1	Dimer Sequenz 1 aus GUS-Vektor in pHis2.1 mittels <i>EcoRI</i> und <i>SacI</i> , Y1H-Gold (Hefe), SD Medium -Trp

4424	4xS1 pHis2.1	Tetramer der Sequenz 1 in Y1H-Gold, SD-Medium -Trp
4466	2xS2 pHis2.1	Dimer Sequenz 2 aus GUS-Vector in pHis2.1 mittels <i>EcoRI</i> und <i>SacI</i> , Y1H-Gold (Hefe), SD Medium -Trp
4425	4xS2 pHis2.1	Tetramer der Sequenz 2 in Y1H-Gold, SD-Medium -Trp
4862	4xS2.1 pHis2.1	Tetramer der Sequenz 2.1 in pHis2.1 mittels <i>SacI</i> und <i>EcoRI</i> ; SD Medium -Trp, Y1H-Gold, Keine Inhibierung bei 100mM 3AT
4816	4xS2mut7 pHis2.1	Tetramer der Sequenz 2 mut7 in pHis2.1 mittels <i>SacI</i> und <i>EcoRI</i> ; SD Medium -Trp, Y1H-Gold, Keine Inhibierung bei 100mM 3AT
4817	4xS2mut9 pHis2.1	Tetramer der Sequenz 2 mut9 in pHis2.1 mittels <i>SacI</i> und <i>EcoRI</i> ; SD Medium -Trp, Y1H-Gold, schwache Inhibierung bei 100mM 3AT
4859	4xS2mut14 pHis2.1	Tetramer der Sequenz 2 mut14 in pHis2.1 mittels <i>SacI</i> und <i>EcoRI</i> ; SD Medium -Trp, Y1H-Gold, Keine Inhibierung bei 100mM 3AT
4860	4xS2mut15 pHis2.1	Tetramer der Sequenz 2 mut15 in pHis2.1 mittels <i>SacI</i> und <i>EcoRI</i> ; SD Medium -Trp, Y1H-Gold, Keine Inhibierung bei 100mM 3AT
4426	4xS15 pHis2.1	Tetramer der Sequenz 15 in Y1H-Gold, SD-Medium -Trp
4586	4xSeq15mut3 pHis2.1	Tetramer der Sequenz 15 mut3 kloniert in der Y1H-Vektor pHis2.1 mittels <i>SacI</i> und <i>EcoRI</i> , Y1H-Gold, SD Medium -Trp

4471	4x22DDDM1S1 pHis2.1	Tetramer der Sequenz 22DDD_M1_S1 in pHis2.1, in Y1H-Gold, SD-Medium -Trp
4526	4x21G-2_M1_S2 pHis2.1	Tetramer der Sequenz 21G-2_M1_S2 kloniert in pHis2.1 mit <i>EcoRI</i> und <i>SacI</i> , amplifiziert aus pBT10-GUS/LUC, In Y1H-Gold, Selektieren auf SD Medium -Trp (3-AT Konzentration für Y1H-Screen: 50mM 3AT)
4048	Y1H-Gold pHis2.1 (leer)	Hefe mit pHis2.1, SD Medium -Trp,
4532	4x22DDD_M1_S1 pHis2.1 + Prey Myb46	Tetramer der Sequenz 22DDDM1S1_pHis2.1 und pDEST_GAD424-Vektor+MYB46-Gen (At5g12870) in Y1H-Gold, zum testen der Interaktion auf 3-AT. Selektion auf SD Medium -Trp/-Leu.
4533	4x22DDD_M1_S1 pHis2.1 + Prey unknown At4g1865	Tetramer der Sequenz 22DDDM1S1_pHis2.1 und pDEST_GAD424-Vektor+unknown-Gen (At4g1865) in Y1H-Gold, zum testen der Interaktion auf 3-AT. Selektion auf SD Medium -Trp/-Leu.
4537	4xS15 pHis2.1 + Erf10- pDEST_GAD424	Tetramer der Sequenz 15 pHis2.1 + Erf10-pDEST_GAD424 in Y1H-Gold-Stamm. Selektion auf SD Medium -Trp/-Leu.
4624	4xS15 pHis2.1 + ORA59- pDEST_GAD424	Tetramer der Sequenz 15 pHis2.1 + ORA59-pDEST_GAD424 in Y1H-Gold-Stamm. Selektion auf SD Medium -Trp/-Leu
4623	4xS15 pHis2.1 + WRKY70- pDEST_GAD424	Tetramer der Sequenz 15 pHis2.1 + WRKY70-pDEST_GAD424 in Y1H-Gold-Stamm. Selektion auf SD Medium -Trp/-Leu

4539	4xS15 pHis2.1 + At4g34410 pDEST_GAD424	Tetramer der Sequenz 15 pHis2.1 + At4g34410-pDEST_GAD424 in Y1H-Gold- Stamm. Selektion auf SD Medium -Trp/- Leu.
4538	4xS15 mut3 pHis2.1 + Erf10-pDEST_GAD424	Tetramer der Sequenz 15 pHis2.1 + Erf10- pDEST_GAD424 in Y1H-Gold-Stamm. Selektion auf SD Medium -Trp/-Leu.
4625	4xS15mut3 pHis2.1 + ORA59- pDEST_GAD424	Tetramer der Sequenz 15 pHis2.1 + ORA59-pDEST_GAD424 in Y1H-Gold- Stamm. Selektion auf SD -Trp/-Leu
4540	4xSequenz 15 mut3 pHis2.1 + At4g34410- pDEST_GAD424	Tetramer der Sequenz 15 mut3-pHis2.1 + At4g34410-pDEST_GAD424 in Y1H-Gold- Stamm. Selektion auf SD Medium -Trp/- Leu.
4541	positiv Kontrolle Y1H- Screen	p53His2 + pGADRec2-53 in Y1H-Gold, SD Medium -Trp/ -Leu
4542	negativ Kontrolle Y1H- Screen	pHis2.1 + pGADRec2-53SD in Y1H-Gold, SD Medium -Trp/ -Leu
4707	Y1H-Gold	Y1H-Gold Stamm für Y1H-Screen; YPAD

8.2 Primer und Oligonukleotide

Tabelle 18: Verwendete Oligos mit der entsprechenden Labornummer und Laborbezeichnung

Nr.	Name der Sequenz	Labor- bezeichnung	Sequenz
5330	MRS-At1g13990	S2_f	ctagtTGTTGAGTCGTTTACGTCACGTCGAGAATTTTCTCt
5331		S2_r	ctagaGAGAAAATTCTCGACGTGACGTAAACGACTCAACAa
6898	MRS-At1g13990_mut1	S2mut1f	ctagtCTCCAGACTACTTACGTCACGTCGAGAATTTTCTCt
6899	(Wehrs, 2013)	S2mut1r	ctagaGAGAAAATTCTCGACGTGACGTAAGTAGTCTGGAGa
6900	MRS-At1g13990_mut2	S2mut2f	ctagtTGTTGAGTCGTCGGTACTGTACTAAGAATTTTCTCt

6901	(Wehrs, 2013)	S2mut2r	ctagaGAGAAAATTCTTAGTACAGTACGGACGACTCAACAa
6902	MRS-At1g13990_mut3	S2mut3f	ctagtTGTTGAGTCGTTTACGTCACGTCGGAGGCCCTCTt
6903	(Wehrs, 2013)	S2mut3r	ctagaAGAGGGGCTCCGACGTGACGTAAACGACTCAACAa
7332	MRS-At1g13990_mut7	S2Mut4_f	ctagtTGTTGGATCGTTTACGTCACGTCGAGAATTTTCTCt
7333		S2Mut4_r	ctagaGAGAAAATTCTCGACGTGACGTAAACGATCCAACAa
7334	MRS-At1g13990_mut8	S2Mut5_f	ctagtTGTTGAGCTGTTTACGTCACGTCGAGAATTTTCTCt
7335		S2Mut5_r	ctagaGAGAAAATTCTCGACGTGACGTAAACAGCTCAACAa
7336	MRS-At1g13990_mut9	S2Mut6_f	ctagtTGTTGAGTCTCTTACGTCACGTCGAGAATTTTCTCt
7337		S2Mut6_r	ctagaGAGAAAATTCTCGACGTGACGTAAGAGACTCAACAa
7338	MRS-At1g13990_mut10	S2Mut7_f	ctagtTGTTGAGTCGTCCACGTCACGTCGAGAATTTTCTCt
7339		S2Mut7_r	ctagaGAGAAAATTCTCGACGTGACGTGGACGACTCAACAa
7340	MRS-At1g13990_mut11	S2Mut8_f	ctagtTGTTGAGTCGTTTGTGTCACGTCGAGAATTTTCTCt
7341		S2Mut8_r	ctagaGAGAAAATTCTCGACGTGACACAAACGACTCAACAa
7342	MRS-At1g13990_mut12	S2Mut9_f	ctagtTGTTGAGTCGTTTACACCACGTCGAGAATTTTCTCt
7343		S2Mut9_r	ctagaGAGAAAATTCTCGACGTGGTGTAACGACTCAACAa
7344	MRS-At1g13990_mut13	S2Mut10_f	ctagtTGTTGAGTCGTTTACGTTGCGTCGAGAATTTTCTCt
7345		S2Mut10_r	ctagaGAGAAAATTCTCGACGCAACGTAAACGACTCAACAa
7320	MRS-At1g13990_mut6	S2Mut11_f	ctagtTGTCTAGTCGTTTACGTCACGTCGAGAATTTTCTCt
7321		S2mut11_r	ctagaGAGAAAATTCTCGACGTGACGTAAACGACTAGACAa
7322	MRS-At1g13990_Mut5	S2Mut12_f	ctagtTACTGAGTCGTTTACGTCACGTCGAGAATTTTCTCt
7323		S2Mut12_r	ctagaGAGAAAATTCTCGACGTGACGTAAACGACTCAGTAa
7324	MRS-At1g13990_Mut4	S2Mut13_f	ctagtCGTTGAGTCGTTTACGTCACGTCGAGAATTTTCTCt
7325		S2Mut13_r	ctagaGAGAAAATTCTCGACGTGACGTAAACGACTCAACGa
7194	MRS-At1g13990_Mut14	S2Mut14_f	ctagtTGTTGAGTCGTTTACGTt
7195	(Röling, 2015) (Tetramer)	S2Mut14_r	ctagaACGTAAACGACTCAACAa
7196	MRS-At1g13990_Mut15	S2Mut15_f	ctagtTGTTGAGTCGTCCACAct
7197	(Röling, 2015) (Tetramer)	S2Mut15_r	ctagaGTGTGGACGACTCAACAa
7073	Verkürzte Version des	S2.1_f	ctagtAGTCGTTTACGTCAactagaAGTCGTTTACGTCAt

7074	MRS-At1g13990	S2.1_r	ctagaTGACGTAAACGACTtctagtTGACGTAAACGACTa
5334	CRM-DJ1E	S15_f	ctagtAGGACTTTTCACCAGTTGGACTTTGAAGCCACCAAt
5445		S15_r	ctagaTTGGTGGCTTCAAAGTCCAACCTGGTGAAAAGCTCTa
7125	CRM-DJ1E_mut1	S15mut4_f	ctagtAGAGTCCCCACCAGTTGGACTTTGAAGCCACCAAt
7126		S15mut4_r	ctagaTTGGTGGCTTCAAAGTCCAACCTGGTGGGGGACTCTa
7127	CRM-DJ1E_mut2	S15mut5_f	ctagtAGGACTTTTCTTCACCAGACTTTGAAGCCACCAAt
7128		S15mut5_r	ctagaTTGGTGGCTTCAAAGTCTGGTGAAGAAAAAGTCTCTa
7005	CRM-DJ1E_mut3	S15_mutdf	ctagtAGGACTTTTCACCAGTTGAGTCCCAAAGCCACCAAt
7006		S15_mutdr	ctagaTTGGTGGCTTTGGGACTCAACTGGTGAAAAGTCTCTa
6908	CRM-DJ1E_mut4	S15_mut3f	ctagtAGGACTTTTCACCAGTTGGACTTTGGGATTGTTGGt
6909	(Wehrs, 2013)	S15_mut3r	ctagaCCAACAATCCCAAAGTCCAACCTGGTGAAAAGTCTCTa
7129	CRM-DJ1E_mut5	S15mut6_f	ctagtAGGACTTTTCACCAGTTGGACTTTGAGGCCACCAAt
7130	(Ahrendt, 2014)	S15mut6_r	ctagaTTGGTGGCCTCAAAGTCCAACCTGGTGAAAAGTCTCTa
7173	CRM-DJ1E_mut6	S15mut7_2f	ctagtAGGACTTTTCACCAGTTGGACTTTGAAGCCACCTAt
7174	(Ahrendt, 2014) (Dimer)	S15mut7_2r	ctagaTAGGTGGCTTCAAAGTCCAACCTGGTGAAAAGTCTCTa
7133	CRM-DJ1E_mut7	S15mut8_f	ctagtAGGACTTTTCACCAGTTGGACTTTGAAGCCGCCAAt
7134	(Ahrendt, 2014)	S15mut8_r	ctagaTTGGCGGCTTCAAAGTCCAACCTGGTGAAAAGTCTCTa
7135	CRM-DJ1E_mut8	S15mut9_f	ctagtAGGACTTTTCACCAGTTGGACTTTGAAACCACCAAt
7136	(Ahrendt, 2014)	S15mut9_r	ctagaTTGGTGGTTTCAAAGTCCAACCTGGTGAAAAGTCTCTa
7137	CRM-DJ1E_mut9	S15mut10_f	ctagtAGGACTTTTCACCAGTTGGACTTTGAAGTTACCAAt
7138	(Ahrendt, 2014)	S15mut10_r	ctagaTTGGTAACTTCAAAGTCCAACCTGGTGAAAAGTCTCTa
7139	CRM-DJ1E_mut10	S15mut11_f	ctagtAGGACTTTTCACCAGTTGGACTTTGAAGCCATTAAt
7140	(Ahrendt, 2014)	S15mut11_r	ctagaTTAATGGCTTCAAAGTCCAACCTGGTGAAAAGTCTCTa
7179	CRM-DJ1E_mut11	S15mut13_2f	ctagtAGGACTTTTCACCAGTTGGACTTTGAAGCCTCCAAt
7180	(Ahrendt, 2014) (Dimer)	S15mut13_2r	ctagaTTGGAGGCTTCAAAGTCCAACCTGGTGAAAAGTCTCTa
7181	CRM-DJ1E_mut12	S15mut14_2f	ctagtAGGACTTTTCACCAGTTGGACTTTGAAGCCCCCAAt
7182	(Ahrendt, 2014) (Dimer)	S15mut14_2r	ctagaTTGGGGGCTTCAAAGTCCAACCTGGTGAAAAGTCTCTa
7040	4CRM-DJ1E_w/o_GCC	S15.2f	ctagtAGGACTTTTCACCAGTTGGACTTTGt

7041	S15.2r	ctagaCAAAGTCCAAGTGGTGAAAAGTCCTa
------	--------	---------------------------------

Tabelle 19: Verwendete Primer mit der entsprechenden Labornummer, Namen und Verwendungszweck

Nr.	Primernamen	Sequenz	Verwendung
6419	Bait_right GUSLUC	GCGAGCTCTCTTGCGGTGCGAC TCTA	Amplifikation von <i>cis</i> - Elementen aus pBT10GUS-d35LUC. Zur Subklonierung in pHIS2.1
6420	Bait_left GUSLUC	ATCGGGAATTAGATCTGTC	
5121	pHis_left	TGGCAAGTGTAGCGGTCA	Amplifikation von <i>cis</i> - Elementen aus pHIS2.1. Kolonien-PCR
5122	pHis_right	TCGTTTATCTTGCTGCTCAT	
6417	Bait_L_GUS	TTCATTAATGCAGCGGATCA	Amplifikation aus pBT10GUS in pBT10GUS-d35SLUC
6418	Bat_R_GUS	GCGAGCTCGGTCTTGCGGTGCG ACTCTA	
6148	GAL4AD-RV	CGTTTTAAACCTAAGAGTCA C	Amplifikation des cDNA Inserts positiver Klone aus der TF-only Library (pDEST-GAD424). Mitsuda <i>et al.</i> , 2010
6149	GAL4AD	CTATTCGATGATGAAGATACC CC	
7087	Prey_attB_fwd	AAGCAGGCTTCATG	Sequenzierung der cDNA aus der TF-only Library
6083	pORE_O2_4719_f	GATCTCCCAGTCACGACGTT	Sequenzierung von pORE; Untersuchung von Überexpr. in <i>A.th.</i>
6084	pORE_O2_4923_r	GATCACGCGTAGCGGATAAC	
7346	GUS75<	GCGATCCAGACTGAATGCC	Sequenzierung von pBT10GUS-d35SLUC
7347	S15_Prom300-SpeI_fwd	GCACTAGTAATAATACAAAAT GGAAGTATTC	Klonierung der nativen CRM-DJ1E Promotorkonstrukte

7348	S15_Prom161bp-SpeI_fwd	GCACTAGTAGGACTTTTCACC AGTTGGACT	
7349	S15_Prom126bp-SpeI_fwd	GCACTAGTAAAAAGTAGGTGA AAGTGAGTTGG	
7350	S15_Promoter-XhoI_rev	CACTCGAGTTTGGGTAAATGT TTGTGTGCATTG	
7198	At1g13990-Prom412-SpeI_fwd	GCACTAGTCCTTACAAGTGAG ATCATTAGGTGAG	Klonierung der nativen MRS-At1g13990 Promotorkonstrukte
7199	At1g13990-Prom155-SpeI_fwd	GCACTAGTAAATTTTGCCTCC ACGAGTTTTTTTTC	
7200	At1g13990-Prom120bp-SpeI_fwd	GCACTAGTTGTTGAGTCGTTT ACGTCACGTCGAG	
7201	At1g13990-Prom85bp-SpeI_fwd	GCACTAGTTTTTCCCGAGAAA ATTAAGAAAGG	
7202	At1g13990-Prom-XhoI_rev	CACTCGAGTGAACTTCCTTC TCTTTCTAATTAC	
6886	ERF10_pORE_fwd	GCTCTAGAATGACCACAGAAA AAGAGAATGTC	Zur Amplifikation von ERF10 aus dem Prey-Vektor zur TA-Klonierung als auch direkte Klonierung
6887	ERF10_pORE_rev	GCGAATTCTTAGGGACTTGCG TTGAGGTCAAG	
7085	ORA59_pORE_fwd	GCTCTAGAATGGAATATCAAA CTAACTTCTTAAGTG	Zur Amplifikation von ORA59 (ERF94) aus dem Prey-Vektor zur TA-Klonierung als auch direkte Klonierung
7086	ORA59_pORE_rev	GCGAATTCTCAAGAACATGAT CTCATAAGCTCTTC	

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Mentor Prof. Dr. Reinhard Hehl, welcher es mir ermöglicht hat, an diesem interessanten und spannenden Thema zu arbeiten. Die hervorragende Betreuung und die anregenden Diskussionen waren eine große Hilfe bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Bei Prof. Dr. Norbert Käufer möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Koreferats bedanken.

Auch an PD Dr. Bittner ein herzliches Dankeschön für die Übernahme des Vorsitzes.

Zudem bedanke ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Hehl für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Ich habe die gemeinsame Zeit sehr genossen. Bei Elke Faurie möchte ich mich herzlichst für die Hilfe bei jeglichen Laborarbeiten bedanken. Deine Urlaubsgeschichten waren immer sehr spannend. Vielen Dank auch an Konstantin Kanofsky, welcher mich nicht nur als Masterstudent, sondern auch als späterer Doktorand in meiner Doktoranden-Zeit begleitet hat. Du hast mich bei allem immer sehr gut unterstützt und deine humorvolle Art war stets eine Bereicherung im Labor. Er zählt nicht nur zu meinen Arbeitskollegen, sondern auch zu meinen Freunden.

Vielen Dank auch an Erik, Maren, Lilith, Lena, Konstantin, Kai, Sarah und Lilian für die experimentellen Ergebnisse eurer Bachelor- bzw. Masterarbeiten. Es war immer sehr schön mit euch und es hat Spaß gemacht, euch zu betreuen.

Außerdem möchte ich mich herzlichst bei der Arbeitsgruppe Fleißner bedanken. Die gemeinsam verbrachte Zeit in den Pausen, ob Kuchen essen oder in die Mensa gehen, hat mir immer sehr viel Spaß bereitet.

Danke an Konstantin, Alina, Lisa und Mike für das Korrekturlesen meiner Doktorarbeit. Vor allem für die Nicht-Wissenschaftler war es sicher nicht die einfachste Lektüre.

Meinen Freunden danke ich für die mentale Unterstützung und für die gemeinsame Zeit nach der Arbeit. Ob es selbstgedrehte Kurzfilme waren oder ruhige Abende vor dem eigenen Heimkino, die Ablenkung von der Arbeit gab mir die Kraft jeden Tag wieder alles zu geben.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie und meinem Freund Kirill ein sehr großes Dankeschön aussprechen. Ihr habt mich stets bei allem unterstützt und immer an mich geglaubt. Nur durch euch habe ich es bis hier her geschafft.